



**MARTA LAINS DA
SILVA BARBOSA**

**ESTUDO DA BIOMASSA DE REACTORES UASB
TRATANDO EFLUENTES DE LACTICÍNIOS**



**MARTA LAINS DA
SILVA BARBOSA**

**ESTUDO DA BIOMASSA DE REACTORES UASB
TRATANDO EFLUENTES DE LACTICÍNIOS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, realizada sob a orientação científica da Dra. Maria Helena Gomes de Almeida Nadaís, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da FCT
(PTDC/AMB/65025/2006)

Dedico este trabalho à minha família, amigos e orientadora

O júri

presidente

Professora Doutora Maria Isabel Aparício Paulo Fernandes Capela
Professora Associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

vogais

Professora Doutora Maria Helena Gomes de Almeida Gonçalves Nadais
(Orientador)
Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Cheng Chia-Yau
Professor Auxiliar Convidado da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

agradecimentos

Desejo agradecer a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, dos quais os seguintes:

A todos do departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro, pela sua presença e capacidade de garantirem o seu bom funcionamento de todos os dias. Especialmente para a minha orientadora, pela disponibilidade e preciosa ajuda na interpretação dos resultados, pela orientação na gestão do tempo e motivação perante adversidades. Ao Prof. Luís Arroja, pela sua extrema capacidade de transmitir conhecimento e despertar de pensamento científico. À Prof. Isabel Capela pela sua análise nas reuniões semanais do grupo e empréstimo de artigos da sua biblioteca repleta de importantes descobertas. À Otília pela sua perspicácia característica do Norte, companheirismo e ajuda no laboratório que se estendeu para lá dos fins-de-semana e feriados. Ao Filipe, nas suas passagens pelo laboratório e ensinamentos sempre bem fundamentados. À Margarida, Micaela e Flávio pela perspectiva prática do laboratório. A todos os Professores que tive a oportunidade de conhecer durante o mestrado, em especial para o Prof. Luís Tarelho e Prof. José Figueiredo pela paciência e ajuda prestada. A todos os mestrandos do grupo de águas que tive a oportunidade de conhecer e que me deram boa disposição (Joana, Artur, Norberto, Carla, as duas Cláudias e João). Aos meus amigos de mestrado que nunca me vou esquecer pelas saídas á noite, idas á praia e férias que passámos juntos (Betty, Tata, Preto, Pedrosa, Jolie, Ricas, Paulinho, Diana, Nuno, Joana Cassidy, Joana Malita, Jessica, Elsa, Juliana, Joana, Bruna, Ricardo, Diogo, Esquilo, Miriam) e ainda aos amigos que me deram a conhecer. À Ana Guapa pela amizade e companhia! À Sofia pelos chás e aspirações que partilhámos. À Cris pelo olha que duas! e pelas novelas que me contas!

Ao Prof. Jorge Leitão pelas análises moleculares, pelas respostas aos e-mails tão rapidamente como a velocidade da luz e pelos esclarecimentos prestados.

À Prof. Adelaide Almeida que me acompanhou de início nesta tarefa e que me ensinou mais do que poderia pedir. Ao Prof. António Calado pelas fotografias e conselhos prestados. A todos do laboratório de microbiologia ambiental da Universidade de Aveiro pela assistência e simpatia (Luísa, Vanessa, Cláudia, Carlos).

Às HLS de Leiria (Filipa, Sílvia, Patrícia, Marta, Laura, Betty, Pipinha, Mónica e Maria) que compreenderam as minhas ausências e que me apoiaram incondicionalmente. Ao Machado pelo apoio e motivação. À Rita e Sérgio pela amizade e pela estadia no Alentejo na melhor altura do ano! À Mafalda e ao seu pequeno benfiquista.

À minha família, especialmente, pai, mãe, irmã e avós por todas as razões possíveis!

palavras-chave

Digestão anaeróbia, metano, reactor UASB, lacticínios, operação intermitente, microrganismos.

resumo

O metano produzido em sistemas de digestão anaeróbia (DA) é uma fonte de energia renovável, e a consolidação desta tecnologia na Europa oferece várias vantagens baseadas nos princípios de sustentabilidade ambientais. A indústria de lacticínios é uma das maiores fontes de efluentes industriais a nível europeu e a sua DA tem atraído bastante interesse devido à elevada carga orgânica que caracteriza estes efluentes. O tratamento de efluentes de lacticínios em reactores UASB com o modo de operação intermitente (fase de alimentação+fase de estabilização) foi demonstrado ser mais eficiente a converter a CQO do influente a metano comparativamente com o modo de operação contínuo típico.

Nesta dissertação, pretendeu-se comparar o desempenho de reactores UASB tratando efluentes de lacticínios com o modo de operação intermitente (reactores A e B) e contínuo (reactor C) durante o arranque até uma carga orgânica volúmica (Bv) de 12 g CQO.L⁻¹.dia⁻¹, usando cargas iniciais diferentes das usadas em estudos anteriores. O desempenho dos reactores em estado estacionário durante cerca de dois anos a essa Bv (reactores A', B' e C') foi caracterizado antes do arranque, bem como foi caracterizada a sua biomassa, tanto ao nível morfológico como molecular.

Das cargas I (Bv de cerca de 1 g CQO.L⁻¹.dia⁻¹) à VII (Bv de cerca de 12 g CQO.L⁻¹.dia⁻¹), o volume de metano produzido aumentou linearmente com o aumento de carga, em todos os reactores, com coeficientes de correlação entre 0,96-0,97. A eficiência de remoção média foi, de uma forma geral, ≥98%. A eficiência de metanização apresentou a mesma tendência que a produção de metano. Nos reactores intermitentes variou entre 69,7-88,3% (reactor A) e entre 56,8-85,8% (reactor B). No reactor C foi inferior e variou entre 36,4-81,3%. O reactor A converteu mais CQO a metano do que o reactor C a todas as cargas investigadas (4-62% superior), e o reactor B nas cargas iniciais (13-53% superior) e finais (9-21% superior). No estado estacionário, a fase de estabilização contribuiu mais do que na carga VII do arranque, para a eficiência de remoção e metanização globais, o que se traduziu, em eficiências de metanização cerca de 21 e 17% superiores às do contínuo. Tal como na carga VII, observou-se uma acumulação de AOV's na fase de alimentação e desaparecimento na fase de estabilização, embora no estado estacionário, o AOV acumulado tenha sido o propionato. As razões apontadas foram a ocorrência preferencial da oxidação sintrófica do propionato na fase de estabilização em estado estacionário, que poderia estar inibida na fase de alimentação devido à degradação de AGCL's nessa fase. A maior diversidade de clones dos géneros *Methanobacterium* e *Syntrophomonas* no reactor intermitente, bem como a presença de clones do género *Syntrophus* em ambos os reactores é discutida e são sugeridos estudos futuros para o melhor entendimento do processo.

keywords

Anaerobic digestion, methane, UASB reactor, dairy wastewater, intermittent operation, microorganisms.

abstract

Methane produced from anaerobic digestion (AD) systems is a source of a renewable form of energy and the settlement of this technology in Europe offers several advantages based on the principles of environmental sustainability. Dairy industry is a major source of industrial wastewater in Europe and the AD of these wastewaters is attractive from the view point of its high organic content. Dairy wastewater treatment using UASB reactors with an intermittent mode of operation (feeding phase with double load+stabilization phase) is more efficient in converting the removed COD to methane (methanization efficiency) as compared with the continuous conventional mode of operation.

In this thesis, we compared dairy wastewater treatment using UASB reactors with an intermittent mode of operation (reactors A e B) and continuous (reactor C) during start-up to an organic loading rate (OLR) of $12 \text{ g CQO.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$, with a different sludge than the one used previously and with different start-up OLR. The performance and biomass of UASB reactors treating dairy wastewater at stationary state, at an OLR of $12 \text{ g CQO.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$ for almost 2 years, was characterized before start-up. Biomass was analysed for morphological and molecular traits.

Methane production increased linearly from loading I (OLR close to $1 \text{ g CQO.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$) to loading VII (OLR close to $12 \text{ g CQO.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$) in all reactors, with correlation coefficients of 0,96-0,97. Average removal efficiency was generally $\geq 98\%$. Methanization efficiency showed the same trend as the methane production. In reactor A varied between 69,7-88,3% and in reactor B between 56,8-85,8%. In reactor C was lower, and varied between 36,4-81,3%. Reactor A converted more COD to methane at all loadings, as compared with reactor C (4-62% higher), and reactor B at the initial (13-53% higher) and final loadings (9-21% higher). At stationary state, stabilization phase contributed more to the global removal and methanization efficiency than loading VII, at start-up, which translated into methanization efficiencies 21 e 17% higher than the continuous mode of operation. Like in loading VII, VFA accumulation occurred during the feeding phase and VFA disappearance during the stabilization phase, although at stationary state the major VFA was propionate. The reasons pointed were preferential syntrophic propionate oxidation during stabilization phase, since it might be inhibited during feeding phase due to the AGCL degradation. Major diversity in clones from the genera *Methanobacterium* and *Syntrophomonas* in the intermittent UASB reactor, and the presence of clones from the genus *Syntrophus* in both reactors is discussed and suggested further studies for the better understanding of the process.

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
1 ENQUADRAMENTO TEÓRICO	1
1.1 MOTIVAÇÃO E ÂMBITO	1
1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	5
2 REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 MECANISMOS DE DIGESTÃO ANAERÓBIA E SUA MICROBIOLOGIA.....	7
2.1.1 <i>Perspectiva geral dos mecanismos de digestão anaeróbia</i>	7
2.1.2 <i>Digestão anaeróbia dos principais grupos de compostos orgânicos</i>	12
2.1.3 <i>Acetogénese e metanogénese</i>	18
2.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA DE EFLUENTES DE LACTICÍNIOS	19
2.2.1 <i>Características gerais dos efluentes</i>	19
2.2.2 <i>Estado da arte no uso de reactores UASB no tratamento de efluentes de lacticínios</i> 23	
3 OBJECTIVOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 EQUIPAMENTO.....	35
4.2 PLANO EXPERIMENTAL	36
4.3 ACTIVIDADE METANOGÉNICA ESPECÍFICA	38
4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	40
4.4.1 <i>Carência química em oxigénio (CQO)</i>	41
4.4.2 <i>pH</i>	42
4.4.3 <i>Alcalinidade</i>	42
4.4.4 <i>Ácidos orgânicos voláteis (AOV'S)</i>	42
4.4.5 <i>Sólidos suspensos totais (SST) e voláteis (SSV)</i>	44
4.4.6 <i>Composição do biogás</i>	45
4.5 ANÁLISES BIOLÓGICAS	45
4.5.1 <i>Análise morfológica</i>	45
4.5.2 <i>Análise molecular</i>	46
4.6 CÁLCULOS.....	46
5 RESULTADOS.....	49
5.1 OPERAÇÃO DOS REACTORES UASB DURANTE O ARRANQUE	49
5.1.1 <i>AMÉ das lamas iniciais</i>	49
5.1.2 <i>Produção de metano</i>	51
5.1.3 <i>Eficiência de remoção e de metanização</i>	56
5.1.4 <i>pH, alcalinidade e AOV's</i>	62
5.1.5 <i>Tabelas-resumo</i>	71
5.2 OPERAÇÃO DOS REACTORES UASB EM ESTADO ESTACIONÁRIO	76
5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA	81
5.3.1 <i>Morfologia</i>	81
5.3.2 <i>Análise molecular</i>	84

6 DISCUSSÃO	89
6.1 OPERAÇÃO DOS REACTORES UASB	89
6.1.1 <i>Condições de arranque</i>	89
6.1.2 <i>Desempenho durante o arranque</i>	91
6.1.3 <i>Comparação com o estado estacionário</i>	97
6.2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA	100
 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	 107
7.1 CONCLUSÕES	107
7.2 PERSPECTIVAS FUTURAS	108
 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 111
 ANEXO	

Lista de Abreviaturas

A-Área

A/A – razão AOV_T /Alcalinidade

Ac – ácido acético

AGCL – ácidos gordos de cadeia longa

Alim - alimentação

AME – actividade metanogénica específica

ADN – ácido desoxirribonucleico

$AOV(s)$ – ácido(s) orgânico(s) volátil(eis)

AOV_T 's – AOV 's total

ATP – trifosfato de adenosina

ARN – ácido ribonucleico

Bv – carga orgânica volúmica ($g\ CQO.L^{-1}.dia^{-1}$ ou $Kg\ CQO.m^{-3}.dia^{-1}$)

C – concentração ($mg.L^{-1}$ ou $Kg.m^{-3}$)

C (%) – percentagem de clones

C_{in} - concentração do influente ou da alimentação ($mg.L^{-1}$ ou $Kg.m^{-3}$)

CI – circulador interno

COT – carbono orgânico total

CQO – carência química em oxigénio

CQO_r - CQO removida

CQO_s – CQO solúvel ou do filtrado

CQO_T – CQO total

CSTR - reactor de mistura completa

DA – digestão anaeróbia

E_M – eficiência de metanização (%)

E_R – eficiência de remoção (%)

Estab – estabilização

ETAI - estação de tratamento de águas industriais

ETAR – estação de tratamento de águas residuais

FA – filtro anaeróbio

FID – detector de ionização de chama

GEE – gases com efeito de estufa

HFK - hidrogenoftalato de potássio

Interm – modo de operação intermitente

K_s - coeficiente de saturação

LD-limite de detecção

m – massa (g ou Kg)

m' – declive da recta de calibração

M – massa molar (g.mol^{-1} ou Kg.Kmol^{-1})
 n – moles (mol ou Kmol)
 N – normalidade (g.L^{-1})
 NAD^+ – dinucleótido de adenina nicotinamida oxidado
 NADH_2 - dinucleótido de adenina nicotinamida reduzido
 OTU's - unidades operacionais taxonómicas
 p – pressão parcial
 P – pressão
 P_{CH_4} – produtividade em metano ($\text{LCH}_4.\text{CQO}_r^{-1}$)
 R – constante dos gases perfeitos (8314 J.Kmol^{-1})
 RE – recirculação do efluente
 RL – recirculação de lamas
 RS – recuperação de soro de leite
 S (%) – percentagem de semelhança
 SBR – reactor descontínuo sequencial
 SIG – separador interno de gorduras
 SSP – *substrate shuttle process*
 SST – sólidos suspensos totais (mg SST.L^{-1} ou Kg SST.m^{-3})
 SSV - sólidos suspensos voláteis (mg SSV.L^{-1} ou Kg SSV.m^{-3})
 T- temperatura ($^{\circ}\text{C}$ ou K)
 TCD - detector de condutividade térmica
 TRH – tempo de retenção hidráulico (horas ou dias)
 TRS – tempo de retenção de sólidos (horas ou dias)
 UB e UBC – bactérias e clones de bactérias não cultivadas
 UAC – clone de *arqueon* ainda não cultivado
 UASB – (reactor de) leito de lamas com fluxo ascendente
 UASBH – UASB híbridos
 UiB – bactéria ainda não identificada
 Q – caudal (L.dia^{-1} ou $\text{m}^3.\text{dia}^{-1}$)
 V – volume (ml ou L)
 ΔG° - energia livre padrão de Gibbs (KJ/mol)
 σ – desvio-padrão
 μ - taxa de crescimento

Lista de Figuras

Figura 1. Produção de biogás por país da União Europeia em 2007.....	3
Figura 2. As principais fases da cadeia trófica metanogénica	8
Figura 3. “Janela termodinâmica” para a formação simultânea de metano a partir de H_2/CO_2 e a acetogénese dos ácidos propiónico e butírico.....	10
Figura 4. Diagrama exemplificativo das operações numa unidade típica de transformação de leite cru em leite para consumo e respectivos consumos e emissões de efluentes industriais.	21
Figura 5. Diagrama exemplificativo do reactor UASB e respectivas zonas que se criam no seu interior.....	24
Figura 6. Diagrama esquemático do reactor.	36
Figura 7. Diagrama esquemático da montagem usada na determinação da actividade metanogénica específica.	39
Figura 8. Evolução da produção de metano ao longo do tempo para a determinação da actividade metanogénica específica.	50
Figura 9. Evolução da produção de metano por ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada.	51
Figura 10. Correlação linear entre a produção de metano por ciclo de operação e a Bv aplicada para os reactores intermitentes (A e B) e contínuo (C).	52
Figura 11. Acumulações de material nas paredes internas do reactor B ao longo das cargas investigadas).	53
Figura 12. Evolução da percentagem média de metano no biogás e da produção média de metano para cada dia de ciclo dos reactores UASB intermitentes (A e B) e para o reactor contínuo (C) ao longo das cargas aplicadas.	54
Figura 13. Evolução da eficiência de remoção (E_R) por ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada.	56
Figura 14. Evolução da eficiência de metanização (E_M) por ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada.....	58
Figura 15. Evolução das eficiências médias de remoção (E_R) e metanização (E_M) para a fase de alimentação (alim) e o global dos ciclos de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e para o reactor contínuo (C) ao longo das cargas aplicadas.	60
Figura 16. Evolução do pH no efluente de saída no final de cada ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada.....	63
Figura 17. Evolução da alcalinidade no efluente de saída no final de cada ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada.	64
Figura 18. Evolução do pH e alcalinidade médios do efluente de saída no final da fase de alimentação (alim) e no final dos ciclos de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e reactor contínuo (C) ao longo das cargas aplicadas.....	65
Figura 19. Evolução dos AOV's no efluente de saída no final de cada ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada.....	67
Figura 20. Evolução da concentração média dos AOV's e da razão $AOV_T/Alcalinidade$ no efluente de saída no final da fase de alimentação (alim) e no final dos ciclos de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e no reactor contínuo (C) ao longo das cargas aplicadas.	69
Figura 21. Produção média de metano por ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A' e B') e contínuo (C') em estado estacionário a uma Bv de $12\text{ g CQO}_T.L^{-1}.dia^{-1}$	76

Figura 22. Evolução da percentagem média de metano no biogás e da produção média de metano para cada dia de ciclo dos reactores intermitentes (A' e B') e para o reactor contínuo (C) em estado estacionário a uma Bv de 12 g CQO _T .L ⁻¹ .dia ⁻¹	77
Figura 23. Eficiência média de remoção e metanização para a fase de alimentação (alim) e o global dos ciclos de operação dos reactores UASB intermitentes (A' e B') e para o reactor contínuo (C') em estado estacionário a uma Bv de 12 g CQO _T .L ⁻¹ .dia ⁻¹	78
Figura 24. Concentração média dos AOV's no efluente de saída para a fase de alimentação (alim) e o final dos ciclos de operação dos reactores UASB intermitentes (A' e B') e para o reactor contínuo (C') em estado estacionário a 12 g CQO _T .L ⁻¹ .dia ⁻¹	79
Figura 25. Observação microscópica da biomassa e sobrenadante dos reactores UASB intermitente (B') e contínuo (C').	82
Figura 26. Distribuição percentual dos clones detectados por análise molecular nos filos presentes nos reactores intermitente (B') e contínuo (C').	84

Lista de Tabelas

Tabela 1. Importância da pressão parcial de hidrogénio na termodinâmica da degradação dos principais intermediários da digestão anaeróbia	10
Tabela 2. Termodinâmica da produção de metano a partir dos diversos substratos dos microrganismos metanogénicos)	19
Tabela 3. Contribuição dos diferentes produtos para a carga orgânica do efluente emitido numa fábrica de lacticínios com multi-produtos.....	21
Tabela 4. Exemplos das principais características dos efluentes de lacticínios e sua comparação com o leite cru.....	23
Tabela 5. Resumo dos principais parâmetros de operação de reactores UASB e tipo-UASB usados no tratamento de efluentes de lacticínios.....	26
Tabela 6. Caracterização físico-química do inoculo inicial	36
Tabela 7. Composição das soluções de nutrientes	37
Tabela 8. Plano experimental de re-arranque para os reactores intermitentes (A e B).....	38
Tabela 9. Plano experimental de re-arranque para o reactor contínuo (C)	38
Tabela 10. Quantidades dos componentes usados na determinação da actividade metanogénica específica.	40
Tabela 11. Calibração do método de análise de AOV's	43
Tabela 12. Fase lag, AME e eficiência de metanização da CQO fornecida com os diferentes substratos usados na determinação da AME das lamas iniciais.	50
Tabela 13. Resumo dos resultados obtidos durante a Fase 2 do plano experimental para o reactor intermitente A.....	73
Tabela 14. Resumo dos resultados obtidos durante a Fase 2 do plano experimental para o reactor intermitente B.....	74
Tabela 15. Resumo dos resultados obtidos durante a Fase 2 do plano experimental para o reactor contínuo (C).....	75
Tabela 16. Resumo dos resultados obtidos durante a Fase 1 do plano experimental para os reactores intermitentes (A' e B') e contínuo (C').	81
Tabela 17. Identificação dos grupos morfológicos de bactérias presentes na biomassa e sobrenadante dos reactores intermitente (B') e contínuo (C').	83
Tabela 18. Sequências semelhantes às detectadas nas amostras de biomassa dos reactores intermitente (B') e contínuo (C') e sua distribuição percentual pelo total de clones detectados.....	86
Tabela 19. Resumo das possíveis funções atribuídas aos clones detectados nos reactores intermitente (B') e contínuo (C').	105

1

ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1.1 MOTIVAÇÃO E ÂMBITO

Desde a primeira descrição da libertação de um gás combustível, o metano (CH_4), a partir de fundos sedimentares, em 1776, até à implementação de sistemas de digestão anaeróbia (DA) praticamente em todo o globo, verificou-se uma grande evolução tanto no entendimento do processo como na engenharia dos sistemas (McCarty, 2001).

A origem microbiológica da produção de metano foi demonstrada em 1880 por Béchamp, altura em que o primeiro sistema de DA já era usado no tratamento de águas residuais domésticas, numa configuração semelhante ao tanque séptico (Oremle, 1988; McCarty, 2001). Na década de 1920, verificou-se uma tendência para a DA de lamas, separadamente das águas residuais domésticas, e para o reconhecimento do valor do metano na geração de electricidade e calor nas estações de tratamento (McCarty, 2001). Esta prática ainda se mantém actualmente (Angenent *et al.*, 2004). A aplicação ao tratamento de águas residuais industriais foi posterior, iniciando-se na Dinamarca em 1929 (Henze, 1997). Apesar deste nascimento antecipado, só a partir da década de 1970 é que a DA se estabeleceu de forma ubíqua com aplicações a larga escala no tratamento de uma variedade de efluentes e resíduos (McCarty, 2001). O fenómeno deveu-se ao aumento da procura por fontes de energia renováveis decorrente da crise do petróleo e ao seu quadruplicar de preço em 1973 (Oremle, 1988; Henze, 1997), às melhorias no entendimento do processo, nomeadamente às importantes contribuições do grupo de Perry McCarty nos Estados Unidos da América (EUA) (Jeris e McCarty, 1965; Lawrence e McCarty, 1969), e por último, à introdução de sistemas de alta carga como o sistema de leito de lamas com fluxo ascendente (*Upflow Anaerobic Sludge Bed*, UASB) desenvolvido na Holanda pelo grupo de Gatze Lettinga (Lettinga *et al.*, 1980).

As aplicações tradicionais do metano produzido em sistemas de DA são a produção de energia e calor *on-site*. No entanto, outras questões da actualidade põem em causa esta restrita utilização. A necessidade de redução das emissões de dióxido de carbono (CO_2) ao abrigo do

protocolo de Quioto, o aumento das necessidades de energia por países em desenvolvimento como a China e Índia, o facto de que a produção de petróleo irá atingir o seu pico num futuro pouco distante e de que nos encontramos no início de uma era de conflitos políticos baseados em contestações pelas reservas de petróleo, colocam a produção de energias renováveis na prioridade da agenda política (Hartmann e Ahring, 2005). A DA, apesar de se tratar de uma tecnologia de energias renováveis madura (Farrell e Gopal, 2008), em 2005, representou apenas 3,6% do total de energia renovável produzida na União Europeia (EEA, 2008). A tendência é de aumentar, mas os objectivos impostos no Livro Branco para as Energias Renováveis não serão cumpridos em 2010 (CE, 1997).

A consolidação da DA na Europa oferece várias vantagens. O conceito de sustentabilidade subjacente ao processo e que engloba vários aspectos como o tratamento de águas e resíduos, a valorização energética, a prevenção de poluição e a recuperação de recursos, permite constituir uma sociedade mais auto-suficiente (Lettinga, 2001). Os benefícios relativamente aos sistemas de tratamento de águas residuais aeróbios incluem, além da produção de biogás, a menor produção de biomassa excedente, a menor necessidade energética e de espaço, a maior eficiência na remoção de microrganismos patogénicos, a menor libertação de odores e a maior adequação das lamas para fertilização de campos agrícolas (Gunnerson e Stuckey, 1986; Ward *et al.*, 2008). Comparativamente com outros sistemas de conversão energética a partir de biomassa, por exemplo os processos de produção de etanol usando *energy crops*, a DA é superior na produção de energia, na redução dos custos de transporte e na simplicidade no processo (Lettinga, 2001).

Tendo em conta que a Directiva Aterros da União Europeia prevê diminuições dos depósitos em aterros na ordem dos 75% em 2010 relativamente a 1995, a DA oferece, neste âmbito, a baixa produção de biomassa excedente juntamente com o possível tratamento de resíduos de classe 3 (resíduos da indústria alimentar, de matadouros e domésticos) (Ward *et al.*, 2008).

Em relação às emissões de gases com efeito de estufa (GEE), este processo pode ter um papel importante na sua redução: primeiro, porque o confinamento de resíduos num digestor reduz as emissões de CO₂ e CH₄ que podem escapar livremente para a atmosfera em aterros ou depósitos; segundo, porque a conversão de CH₄ em electricidade e calor reduz as emissões associadas ao uso de combustíveis fósseis para a obtenção da mesma quantidade de energia; terceiro, porque pode substituir o uso de combustíveis fósseis no sector dos transportes; e quarto, porque permite a redução da quantidade de fertilizantes sintéticos usados na agricultura com a aplicação de lamas em solos (Ward *et al.*, 2008; Holm-Nielsen *et al.*, 2009).

A utilização do CH₄ como energia renovável tem o potencial de fornecer cerca de 25% do total de energias renováveis na União Europeia no futuro (Holm-Nielsen *et al.*, 2009). O facto de a previsão do biogás para 2010, estar aquém do objectivo do Livro Branco para as Energias Renováveis, deve-se principalmente à realização de esforços tardios por parte das entidades governamentais e à necessidade do desenvolvimento de processos mais competitivos e eficientes

a larga escala que permitam, nomeadamente, ultrapassar rapidamente os custos iniciais de construção (Hartmann e Ahring, 2005; Euroserv'ER, 2008).

Actualmente, os esforços mais significativos estão a ser realizados na Alemanha, o maior produtor europeu de biogás. Neste país verificou-se um uso acrescido de pequenos digestores em quintas agrícolas (71% do total de biogás) e a implementação de leis que incluem, nomeadamente, a injeção de biogás purificado (CH_4) na rede de gás natural com benefícios para os produtores. A estimativa da produção de biogás por país da União europeia referente ao ano de 2007 apresenta-se na Figura 1. A seguir à Alemanha encontra-se o Reino Unido, com a maior quota de produção atribuída ao biogás produzido em aterros (88%). Este sistema é favorecido neste país por ser de baixo custo. A Dinamarca encontra-se em franco desenvolvimento na produção de biogás. Cerca de 60% do calor usado no aquecimento de casas e estabelecimentos é obtido a partir desta fonte de energia (*district heating*) e um dos objectivos governamentais é o de aumentar o número de centrais de co-digestão. Interessante é também o caso da Suécia, onde as maiores fontes de biogás são as estações de tratamento anaeróbias, e onde, para além do uso em *district heating*, do *input* na rede de gás natural e produção de electricidade, cerca de 16% do biogás produzido é usado como combustível no ramo automóvel (Euroserv'ER, 2008).

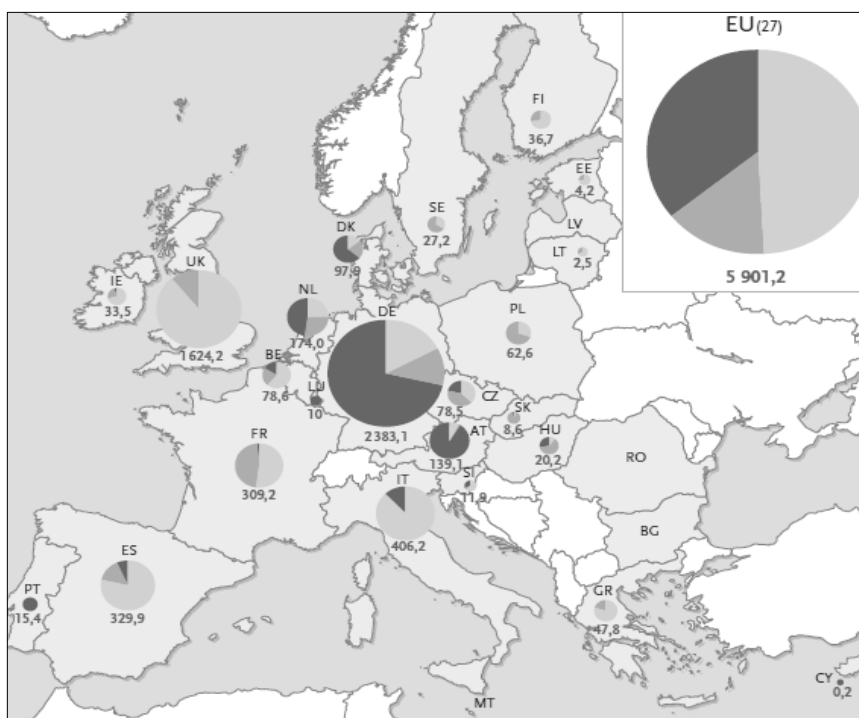


Figura 1. Produção de biogás por país da União Europeia em 2007 (Legenda dos gráficos circulares: do mais claro para o mais escuro - biogás de aterros, biogás de estações de tratamento anaeróbias, biogás de unidades descentralizadas de agricultura; valores em ktep: kilotoneladas equivalentes de petróleo) (Fonte: (Euroserv'ER, 2008)).

Em Portugal, a produção de biogás contabilizada no Eurobarómetro (Euroserv'ER, 2008), deveu-se exclusivamente à produção em unidades descentralizadas de agricultura. Sabe-se, no

entanto, que a indústria agro-alimentar, a digestão de lamas em Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR's) municipais e os aterros também contribuem para a produção nacional de biogás, embora em menor escala (ADENE e INETI, 2001). Em 2004, existiam 71 unidades de digestão anaeróbia no país que, juntamente com os aterros, produziram um total de 14 GWh, equivalente a 0,1% do total de energia renovável produzida em Portugal nesse ano (AREAC, 2004; DGEG, 2009.). Em 2008, o biogás originou 67 GWh de energia, o que equivaleu a 0,45% da energia renovável produzida (DGEG, 2009). Apesar do aumento, estes valores estão bastante abaixo da média da União Europeia. As razões para a baixa produção de biogás em Portugal são apontadas por Di Berardino e Di Berardino (2008) como a falta de investimento no processo antes da adesão de Portugal à União Europeia, a baixa eficiência de alguns sistemas construídos, a flexibilidade na legislação que permitiu, por exemplo, a libertação de grandes quantidades de efluentes de suiniculturas nos cursos de água devido a pressões económicas, e a falta de unidades centralizadas de co-digestão de resíduos de agricultura. Os autores referem também as oportunidades da adopção da DA no nosso país, prevendo a criação de cadeias integradas de valorização de resíduos que, com este processo, resultarão no desenvolvimento de novas actividades e emprego. Em última análise, isto só será possível com a aplicação de instrumentos políticos que favoreçam a digestão anaeróbia.

Em países como os EUA, onde a economia e os grupos defensores do tratamento aeróbio ditam contra o uso de sistemas de AD, bem como em países em desenvolvimento onde as actividades do sector primário são responsáveis por elevadas emissões de metano para a atmosfera, as oportunidades de capitalização de GEE poderão ser especialmente úteis na adoção da DA nesses países (Farrell e Gopal, 2008). É de referir, no entanto, o caso da Índia e da China onde a DA de resíduos domésticos e de agricultura tem sido já implementada extensivamente (Lettinga, 2001).

A descrição da situação actual da DA não ficaria completa sem a referência aos desenvolvimentos na área da microbiologia do processo, e que é responsável pelos maiores avanços na DA nos últimos anos. A razão para este facto reside no aparecimento de técnicas modernas de biologia molecular e na possibilidade de cultivo de alguns microrganismos anaeróbios recalcitrantes (Sekiguchi *et al.*, 2001; Narihiro e Sekiguchi, 2007; Rozej *et al.*, 2008; Talbot *et al.*, 2008). As ferramentas mencionadas permitem integrar e explorar os conceitos de ecologia microbiana em sistemas de engenharia biologicamente otimizados para um determinado objectivo (McMahon *et al.*, 2007). Porque é necessário uma situação de equilíbrio dinâmico entre as espécies microbianas para a realização de uma digestão anaeróbia equilibrada (Chynoweth e Mah, 1971), a compreensão das alterações nas populações devido a factores ambientais é considerada essencial para o controlo e optimização do processo (Mergaert e Verstraete, 1987).

Em termos gerais, os objectivos deste trabalho incluem o estudo da operação de reactores UASB com um modo de funcionamento optimizado para a produção de metano (funcionamento intermitente) e a caracterização da comunidade microbiana aí desenvolvida. Estes resultados serão comparados com o modo de operação convencional (funcionamento contínuo) e

interpretados à luz do conhecimento obtido sobre a microbiologia do processo. Os digestores serão operados com o efluente de uma agro-indústria, a indústria dos lacticínios. Este tipo de efluente tem atraído bastante interesse no contexto da DA uma vez que apresenta elevada carga orgânica, o que torna viável o balanço energético mesmo quando é necessário aquecer o digestor (Angenent *et al.*, 2004).

1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Feita uma breve abordagem aos princípios que motivam a realização deste estudo neste capítulo, os conteúdos que se seguem dividem-se em 6 capítulos:

Capítulo 2. É apresentada uma perspectiva geral dos mecanismos biológicos inerentes ao processo de digestão anaeróbia com ênfase na degradação de efluentes da indústria de lacticínios em reactores UASB e na microbiologia do processo.

Capítulo 3. Descreve-se os objectivos do estudo, nomeadamente, o que se pretende determinar com o plano experimental apresentado no Capítulo 4.

Capítulo 4. Apresentam-se as fases de estudo e o delineamento do plano experimental de forma a serem cumpridos os objectivos propostos no Capítulo 3. Também são descritas as metodologias e especificados os equipamentos e reagentes utilizados.

Capítulo 5. Faz-se a apresentação dos resultados de operação dos reactores UASB em estudo na forma gráfica e na forma de Tabelas-resumo. Interpreta-se os resultados de operação dos reactores com ênfase no seu desempenho perante aumentos da carga orgânica volúmica e em estado estacionário. Apresentam-se e analisam-se os resultados de caracterização morfológica e molecular da comunidade microbiana.

Capítulo 6. Discute-se os resultados obtidos com base na literatura e estabelece-se o paralelismo entre o desempenho dos reactores e a sua caracterização microbiológica.

Capítulo 7. Apresentam-se as conclusões do estudo realizado, recapitulando os objectivos propostos e os principais resultados obtidos. Faz-se também recomendações para o prosseguimento de estudos relacionados com a temática abordada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MECANISMOS DE DIGESTÃO ANAERÓBIA E SUA MICROBIOLOGIA

2.1.1 PERSPECTIVA GERAL DOS MECANISMOS DE DIGESTÃO ANAERÓBIA

A digestão anaeróbia (DA) é o processo biológico através do qual os materiais orgânicos são degradados na ausência de oxigênio para produzir um gás combustível, o metano (CH_4), e dióxido de carbono (CO_2), designado em conjunto por biogás (Gunnerson e Stuckey, 1986). Outros componentes como o hidrogênio molecular (H_2), sulfureto de hidrogênio (H_2S) e azoto (N_2 , NH_3) estão presentes no biogás em quantidades vestigiais (Henze, 1997).

O processo de DA realiza-se numa sequência de 4 fases principais por um consórcio microbiano que inclui membros dos domínios Bacteria e Arquea, constituindo-se a designada cadeia trófica metanogénica (Angenent *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2000; Talbot *et al.*, 2008) (Figura 2). Inicialmente, os microrganismos acidogénicos ou fermentativos segregam enzimas extracelulares que catalizam a hidrólise dos polímeros existentes no substrato a monómeros e oligómeros. Estes compostos solubilizados são transportados para o interior das suas células, onde se realiza a fermentação a compostos mais simples. Estes compostos designam-se como os intermediários da DA, e incluem maioritariamente os ácidos orgânicos voláteis (AOV's), bem como álcoois, ácido láctico e acetonas. Na fase seguinte, a acetogénica, estes intermediários servem de substrato aos microrganismos acetogénicos e produtores de hidrogénio que catalizam a sua conversão a compostos ainda mais simples como o acetato e o $\text{H}_2 + \text{CO}_2$, respectivamente. No topo da cadeia trófica realiza-se a conversão destes últimos a metano. Foi demonstrado por (Jeris e

McCarty, 1965) que o acetato é o precursor de cerca de 70% do metano obtido durante os processos de digestão anaeróbia devido à metanogénese acetotrófica. O H_2+CO_2 pode ser convertido a acetato por microrganismos acetogénicos ou a metano por um processo designado por metanogénese hidrogenotrófica. Outros substratos da metanogénese podem ser compostos simples metilados (Ex. formato) ou álcoois+ CO_2 (Garcia *et al.*, 2000).

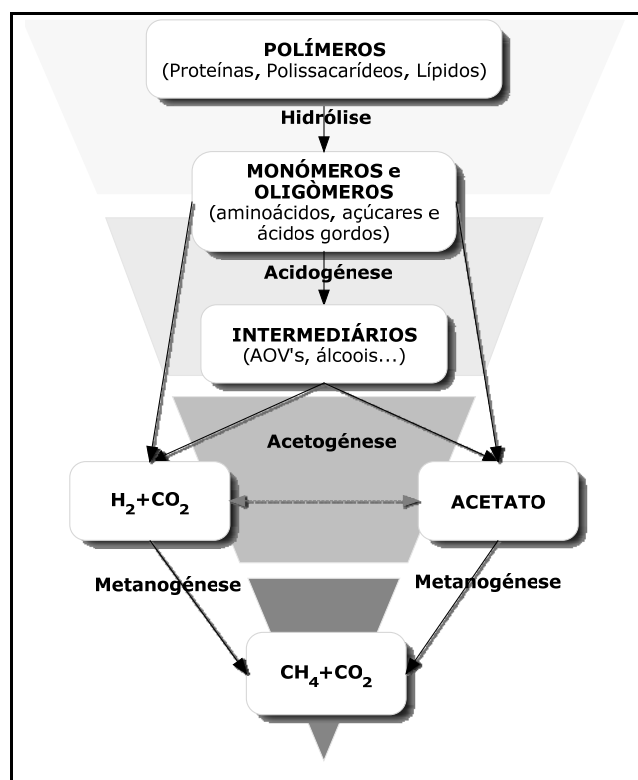
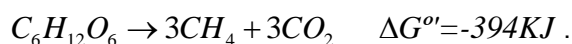
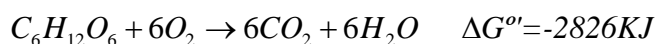


Figura 2. As principais fases da cadeia trófica metanogénica (baseado em (Angenent *et al.*, 2004; Talbot *et al.*, 2008))

A degradação de compostos orgânicos complexos em compostos mais simples é concomitante com a produção de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP). O ATP é o principal composto de armazenamento de energia nas células e é essencial ao crescimento dos microrganismos. A obtenção de ATP por este processo designa-se por catabolismo. Como a digestão anaeróbia ocorre na ausência de oxigénio, o catabolismo anaeróbio realiza-se através da redução de compostos inorgânicos como o nitrato (NO_3^-), sulfato (SO_4^{2-}) ou CO_2 , e compostos orgânicos. Durante a redução de compostos orgânicos, a produção de energia procede via oxidação-redução do composto em si e designa-se por fermentação (Thauer *et al.*, 1977; Gunnerson e Stuckey, 1986).

Comparativamente com o catabolismo aeróbio ou respiração, no catabolismo anaeróbio cerca de 85% da energia potencial de oxidação do substrato inicial é conservada na molécula de metano. Isto pode ser observado, considerando o catabolismo de uma molécula de glucose nas duas condições,



A energia livre padrão de Gibbs (ΔG°) de cada reacção é negativa, ou seja, com produção de ATP. No entanto, enquanto que a redução de uma molécula de glucose origina 38 ATP's durante a respiração, na degradação anaeróbia apenas são formados 5-6 ATP's e esta energia é partilhada pelos grupos de microrganismos envolvidos na cadeia trófica metanogénica (Schink, 1988). Assim se justifica a baixa taxa de crescimento dos microrganismos anaeróbios. Por exemplo, uma célula crescendo em condições anaeróbias tem de degradar cerca de 20x mais glucose de forma a obter a mesma quantidade de energia para o crescimento de uma célula em condições aeróbias (Gunnerson e Stuckey, 1986).

A limitada disponibilidade energética na cadeia trófica metanogénica resulta na formação de cooperações entre espécies bastante eficientes para a remoção dos produtos de catabolismo como forma de optimização da conservação de energia e do crescimento (Lowe *et al.*, 1993). Esta cooperação poderá ser de tal forma importante, que ambos os parceiros dependem um do outro para realizar a actividade observada, designando-se, neste caso, por sintrofismo (Schink, 2000). Nas cooperações sintróficas é explorada a alteração mínima de energia, obtida durante uma reacção, para a sobrevivência das células cooperantes (Schink, 1997).

Historicamente, o sintrofismo foi pela primeira vez identificado por Bryant *et al.* (1967) durante a degradação de etanol a acetato e metano por uma co-cultura entre um microrganismo fermentativo, a estirpe S, e um metanogénico *Methanobacillus omelianskii*, estirpe M.O.H.. A fermentação do etanol pela estirpe S ocorre a pressões parciais de hidrogénio bastante baixas ($\leq 10^{-3}$ bar), e por isso, esta reacção apenas foi possível porque o microrganismo metanogénico removeu o H_2 libertado. Da mesma forma, este último apenas pôde crescer em etanol devido à presença da estirpe S.

Este tipo de sintrofismo baseia-se na transferência de hidrogénio inter-espécies e ocorre na fermentação dos seguintes compostos: etanol, propionato, butirato, ácidos gordos de cadeia ramificada, acetato e compostos aromáticos (Schink, 2000). Geralmente, os principais intermediários obtidos durante a digestão anaeróbia são os ácidos orgânicos voláteis (AOV's), também designados por ácidos gordos, dos quais o acetato, propionato e butirato são maioritários (Boone, 1982; McInerney, 1988). A sua degradação a acetato, na fase acetogénica da DA, designa-se por oxidação sintrófica dos ácidos gordos (Schink, 2000). Como se pode ver a partir da Tabela 1., a oxidação destes compostos é por norma endergónica ($\Delta G^{\circ} > 0$, com consumo de ATP). No entanto, se o hidrogénio libertado for removido por microrganismos utilizadores de hidrogénio, como os metanogénicos hidrogenotróficos, a reacção torna-se exergónica, com formação de ATP, num ambiente limitado em termos de disponibilidade energética (Schink, 2000;

McInerney *et al.*, 2008). A pressão parcial de H_2 (pH_2) necessária à oxidação sintrófica dos ácidos gordos, com produção de ATP, ou seja exergónica, também se exemplifica na Tabela 1.

Tabela 1. Importância da pressão parcial de hidrogénio na termodinâmica da degradação dos principais intermediários da digestão anaeróbia (Schink, 2000; McInerney *et al.*, 2008)

Reacções	$\Delta G^{\circ'}$	pH_2 para $-\Delta G^{\circ'}$
$Acetato^- + H^+ + 2H_2O \rightarrow 2CO_2 + 4H_2$	+ 94,9	$<10^{-4}$
$Propionato^- + 3H_2O \rightarrow Acetato^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$	+ 76,1	$<10^{-4}$
$Butirato^- + 2H_2O \rightarrow 2Acetato^- + 2H^+ + 2H_2$	+ 48,3	$<10^{-4}$

A cooperação sintrófica entre os microrganismos acetogénicos e os microrganismos metanogénicos hidrogenotróficos deriva não só da necessidade por baixas pressões parciais de hidrogénio pelos primeiros, como também da ocorrência de pH_2 adequadas para a sua utilização pelos segundos. Como tal, depende da designada “janela termodinâmica” que se estabelece entre a pH_2 e a $\Delta G^{\circ'}$ associada a estas reacções (Aivasidis e Diamantis, 2005) (Figura 3.). A $\Delta G^{\circ'}$ mínima associada a uma reacção exergónica é de -20 KJ para a produção de 1 ATP.

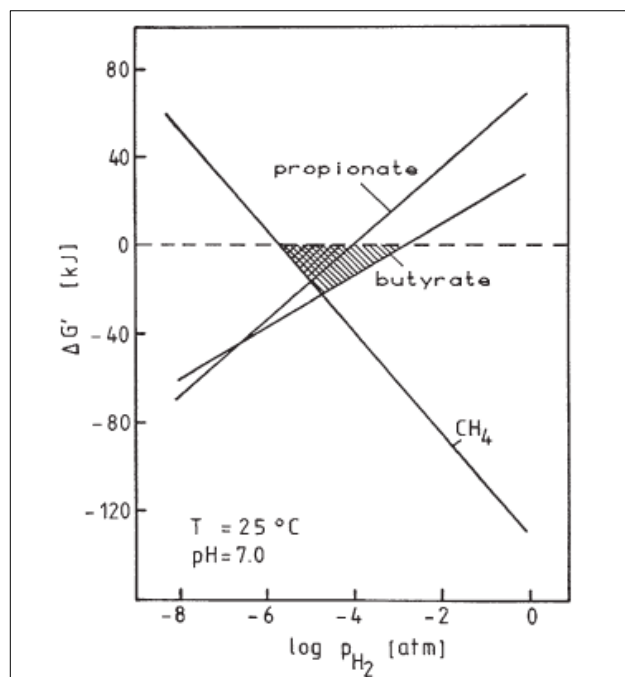


Figura 3. “Janela termodinâmica” para a formação simultânea de metano a partir de H_2/CO_2 e a acetogénese dos ácidos propiónico e butírico (Aivasidis e Diamantis, 2005).

As cooperações sintróficas não se estabelecem apenas ao nível da transferência de H_2 interespecies na cadeia trófica metanogénica. Outra forma de sintrofismo poderá residir na transferência de formato ($HCOO^-$). Devido às baixas concentrações de H_2 e $HCOO^-$ em ambientes

anaeróbios, geralmente abaixo dos níveis de detecção dos equipamentos disponíveis para o efeito, a importância relativa da transferência de cada um destes compostos ainda é alvo de discussão (Stams, 1994; Schink, 2000). Por outro lado, tanto as espécies acetogénicas como as metanogénicas podem libertar e consumir H_2 ou $HCOO^-$, respectivamente (Blaut, 1994; de Bok *et al.*, 2004). Também não é consensual qual a via mais eficaz em termos de velocidade de transferência. Apesar do $HCOO^-$ ter uma solubilidade cerca de 1000x superior à do H_2 , este último, tem uma capacidade de difusão em ambientes aquosos cerca de 30x superior (Stams, 1994; de Bok *et al.*, 2004).

A transferência de acetato inter-espécies também é importante durante a acetogénese, particularmente, durante a oxidação sintrófica dos ácidos gordos. A transferência de acetato ocorre entre os microrganismos acetogénicos e os metanogénicos acetoclásticos (Schink, 2000).

Em suma, a pressão parcial de H_2 e as concentrações de acetato e $HCOO^-$, em sistemas anaeróbios, são importantes para uma digestão anaeróbia equilibrada, que depende, em primeiro lugar, do fluxo de carbono e electrões entre microrganismos sintróficos. No entanto, os compostos intermediários, referidos atrás para a cadeia trófica metanogénica, também são importantes porque reflectem um desequilíbrio entre a actividade dos grupos de microrganismos presentes (Schink, 1988). A produção de biogás, por sua vez, reflecte todos estes processos, além de ser também uma medida da saúde da população metanogénica, o grupo microbiano mais sensível a factores ambientais (Seagren *et al.*, 1991).

A percentagem (%) de CH_4 no biogás é uma consequência da redução da CQO presente no influente que pode ser calculada de uma forma simples a partir da seguinte fórmula empírica:

$$C_n H_a O_b + \left(n - \frac{a}{4} - \frac{b}{2}\right) H_2 O \rightarrow \left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4}\right) CH_4 + \left(\frac{n}{2} - \frac{a}{8} + \frac{b}{4}\right) CO_2.$$

Assim, conhecendo-se os compostos presentes no influente é possível determinar, teoricamente, a % de CH_4 no biogás. De uma forma simplificada tem-se, para os lípidos uma % de CH_4 de 67-74%, para as proteínas de 50-58% e para os hidratos de carbono de 50% (Gujer e Zehnder, 1983). Por este motivo, propomo-nos a abordar, de seguida, e em pormenor, os mecanismos e a microbiologia associada à digestão anaeróbia destes compostos em particular, bem como os principais factores que afectam a sua DA. Pretende-se dar importância à degradação dos compostos presentes nos efluentes de lacticínios e por isso, não será abordada a degradação de hidratos de carbono complexos como a celulose e o amido.

2.1.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA DOS PRINCIPAIS GRUPOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

2.1.2.1 HIDRÓLISE E ACIDOGÊNESE DE AÇÚCARES

Os dissacarídeos podem ser hidrolisados no meio extracelular aos seus monossacarídeos constituintes, por exoenzimas (Gerardi, 2003), ou ser transportados para o interior dos microrganismos onde são hidrolisados por endoenzimas (Cocaign-Bousquet *et al.*, 2002).

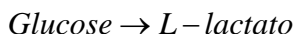
No caso da lactose, a enzima envolvida é a β -galactosidase, hidrolizando o dissacarídeo a glucose e galactose (O'Leary e Woychik, 1976). A fermentação da glucose realiza-se em dois passos principais: primeiro é oxidada a piruvato pela via Embden-Meyerhof glicolítica, assumida como ocorrendo de forma generalista em todos os microrganismos anaeróbios, e segundo, o piruvato é transformado em biomassa celular e produtos. Simultaneamente, a coenzima NAD^+ é reduzida a NADH_2 no primeiro passo e regenerada por oxidação no segundo (Ruzicka, 1996). A galactose entra na via glicolítica após processamento por outra via (Ex. via Leloir) (Cocaign-Bousquet *et al.*, 2002).

Os produtos obtidos durante a fermentação de açúcares dependem de uma variedade de factores. Nas experiências de Zoetemeyer *et al.* (1982), usando uma cultura mista num reator de mistura completa (*completely stirred tank reactor* - CSTR), os produtos maioritários obtidos durante a fermentação da glucose foram o ácido butírico, acético, propiónico, láctico, hidrogénio e etanol, com dominância do ácido butírico. Estes são considerados os produtos normais de uma fermentação de açúcares (Vavilin *et al.*, 1995). Nesse estudo, foi investigada a influência do pH e do tempo de retenção hidráulico (TRH), tendo-se verificado que a diminuição de pH (de 6,44 para 5,69) e do TRH, provocou uma diminuição da produção de H_2 e de ácido butírico bem como o aumento simultâneo de ácido propiónico e láctico (*shift* metabólico). Vavilin *et al.* (1995) postularam que os microrganismos capazes de realizar a fermentação a ácido propiónico dependiam do H_2 para fermentar a glucose, e por isso, foram responsáveis pelo consumo de H_2 a baixo pH e TRH, quando começaria o seu crescimento no sistema. O seu crescimento resultaria numa competição pela glucose com os microrganismos de fermentação a ácido butírico, e por isso, os produtos da fermentação a ácido propiónico aumentaram. Neste caso, o H_2 terá sido responsável pelo *shift* metabólico da fermentação da glucose, provocado por alterações de pH. Noutro estudo semelhante, Temudo *et al.* (2007) verificaram o oposto, ou seja, uma diminuição na produção de H_2 com o aumento do pH do meio. Os produtos obtidos também foram diferentes. O *shift* metabólico ocorreu de uma fermentação a ácido acético, butírico e glicerol para uma fermentação a ácido acético e etanol com maior produção de iões H^+ , para re-equilíbrio do pH.

Se as alterações verificadas nos produtos obtidos se devem a alterações no metabolismo das populações microbianas ou das populações em si, ainda permanece por explicar (Vavilin *et al.*, 1995). Num estudo realizado por Fernandez *et al.* (2000), a realização de um choque de glucose resultou em alterações dos produtos obtidos e da comunidade presente. A alteração na

comunidade foi tanto menor quanto maior a estabilidade da comunidade inicial. Essa estabilidade poderá não ser baseada num menor número de espécies, mas numa maior estabilidade funcional que permite a essa comunidade ser flexível nas vias metabólicas. O *shift* metabólico numa comunidade pode ocorrer entre o que se designam por vias ramificadas a partir do mesmo substrato. Por outro lado, o mesmo microrganismo poderá apresentar diferentes vias metabólicas consoante as condições do meio. Tomemos como exemplo a fermentação da glucose em *Lactococcus lactis*,

- Em condições de glucose em excesso realiza uma fermentação homoláctica:



- Em condições de glucose-limitantes realiza uma fermentação ácida mista:



e quando foi fornecida glucose, de novo ao meio, voltou a realizar-se uma fermentação homoláctica (Thomas *et al.*, 1979).

A capacidade de fermentação de açúcares é de uma forma geral aceite em membros dos géneros *Clostridium* (Collet *et al.*, 2004; Ferchichi *et al.*, 2005; Calli *et al.*, 2008; Song e Dongi, 2008; Li *et al.*, 2009), *Lactobacillus* (Fu e Mathews, 1999; Carcoba *et al.*, 2004; Castello *et al.*, 2009), *Lactococcus* (Cocaign-Bousquet *et al.*, 2002), *Bacteroides* (Chynoweth e Mah, 1977; De Haast e Britz, 1987), *Spirochaeta* (Hespell e Canale-Parola, 1973; Janssen e Morgan, 1992; Fernandez *et al.*, 2000), *Streptococcus* (LeBlanc *et al.*, 1979; Thomas *et al.*, 1979; Poolman *et al.*, 1987; Fernandez *et al.*, 2000), *Propionibacterium* (Barbirato *et al.*, 1997; Himmi *et al.*, 2000; Martínez-Campos e de la Torre, 2002), *Porphyromonadaceae* (Li *et al.*, 2009), *Acetobacterium* (Winter e Wolfe, 1979), *Moorela* (Talabardon *et al.*, 2000) e *Thermoanaerobacteriaceae* (Azbar *et al.*, 2009). A capacidade de fermentação do lactato, quando é considerado como um intermediário na fermentação de lactose e glucose, foi atribuída a microrganismos acidogénicos membros dos géneros *Pectinatus* (Castello *et al.*, 2009), *Megasphaera* (Castello *et al.*, 2009), *Butyivibrio* (Fernandez *et al.*, 2000), *Desulfovibrio* (Chartrain e Zeikus, 1986), para além de outros géneros referidos atrás.

Além da influência do pH, da concentração de substrato e das populações microbianas presentes, outros factores afectam os produtos obtidos durante a fermentação de açúcares. A inibição pelo produto foi observada por Veenheuvel *et al.* (1988) através da adição de ácido butírico durante a fermentação da glucose. A pH 5,6, a adição de ácido butírico inibiu o crescimento dos microrganismos acidogénicos enquanto que a pH 6,5 não teve qualquer efeito. A explicação baseia-se no facto de que a baixo pH, os ácidos orgânicos encontram-se na sua forma indissociada (Ex. CH_3COOH , ácido acético), entrando facilmente nas células, onde se dissociam (Ex. CH_3COO^- , acetato), o que provoca a abolição do gradiente de pH transmembranar. A alcalinidade também foi demonstrada ser importante no *shift* entre o ácido láctico e o ácido butírico durante a digestão anaeróbia de glucose (Lun *et al.*, 1995). O tempo de retenção de sólidos (TRS) variou de forma proporcional à produção de H_2 num digestor-tipo quimiostato alimentado a glucose

(Lin e Chang, 1999). O tempo de retenção hidráulico (TRH) foi inversamente proporcional à produção de H_2 num CSTR alimentado a glucose (Wu *et al.*, 2008). Num estudo realizado por Bengtsson *et al.* (2008), verificou-se que para TRH superiores a 10 horas, ocorreu um *shift* da fermentação de permeado de leite (composto maioritariamente por lactose) de ácido butírico para ácido propiónico. Estes resultados poderão ser explicados pelo estudo de Vavilin *et al.* (1995). Outros factores que influenciam a fermentação de açúcares são a presença de outros compostos como os ácidos orgânicos de cadeia longa (AGCL) (Lalman e Bagley, 2002; Alosta *et al.*, 2004; Lalman *et al.*, 2004) e as proteínas (Bai *et al.*, 2004).

A actividade dos microrganismos metanogénicos hidrogenotróficos resulta na remoção de H_2 , que influencia a termodinâmica da acidogénese dos açúcares (Voolapalli e Stuckey, 2001). A actividade dos microrganismos acetogénicos também é importante para a degradação de açúcares a metano, uma vez que cerca de 67% do metano produzido em digestores alimentados a hidratos de carbono advém do acetato (Jeris e McCarty, 1965).

2.1.2.2 HIDRÓLISE E ACIDOGÉNESE DE PROTEÍNAS

As proteínas são hidrolizadas no meio extracelular a péptidos e aminoácidos, numa reacção catalizada por proteases (McInerney, 1988). Estas enzimas podem ocorrer livres no meio extracelular ou estar associadas às membranas dos microrganismos proteolíticos (Parawira *et al.*, 2005). Se os péptidos obtidos durante a hidrólise das proteínas forem suficientemente pequenos, podem entrar nas células através pelos sistemas de transporte, ou então sofrer hidrólise extracelular aos seus aminoácidos constituintes (Juillard *et al.*, 1995). As enzimas envolvidas na hidrólise de péptidos são as peptidases (Gujer e Zehnder, 1983).

A hidrólise de proteínas é geralmente considerada como o passo limitante durante a sua digestão anaeróbia, ocorrendo mais lentamente do que a hidrólise de hidratos de carbono e lípidos (Gujer e Zehnder, 1983; Pavlostathis e Giraldo-Gomez, 1991; Appels *et al.*, 2008). Foi verificado que uma fracção recalcitrante de proteínas permanece inalterada após a realização da digestão anaeróbia de substratos ricos em proteínas (Pavlostathis e Gossett, 1986; Guerrero *et al.*, 1999). Este facto poderá ser explicado devido aos efeitos inibitórios da presença de açúcares, nesses substratos, na produção ou actividade das proteases, tal como foi sugerido por Elefsiniotis e Oldham (1994), ou pelo facto dos microrganismos preferirem os açúcares em detrimento das proteínas tal como foi sugerido por Breure *et al.* (1986b) e Yu e Fang (2001). No entanto, a observação de que, geralmente, permanece uma fracção de proteínas não hidrolisadas após a realização da sua digestão anaeróbia, também foi verificada em estudos usando proteínas modelo como única fonte de carbono (Fang *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 2005), e por este motivo, Breure *et al.* (1986b), postularam que a presença de açúcares se reflectiu numa menor taxa de hidrólise, comparativamente com a sua ausência, durante a degradação anaeróbia de gelatina.

A fermentação dos aminoácidos obtidos com a hidrólise de proteínas e péptidos é um processo complexo. De uma forma geral, os aminoácidos são fermentados por uma de três vias consoante o aminoácido e o microrganismo presente: a via de *Stickland* que envolve a oxidação-redução entre pares de aminoácidos; a via de desaminação oxidativa ou descarboxilação; e a via da transaminação seguida de uma descarboxilação oxidativa directa ou uma descarboxilação e oxidação (McInerney, 1988). Segundo Batstone *et al.* (2003), a via de *Stickland* é assumida como a via de fermentação de aminoácidos em digestores anaeróbios porque é a via mais rápida.

No rúmen, a fermentação de aminoácidos é levada a cabo pelos microrganismos que realizam a fermentação de açúcares, uma vez que, a sua degradação isolada não fornece energia suficiente para o crescimento. Já nos digestores anaeróbios, crê-se que a fermentação de aminoácidos é realizada sobretudo por microrganismos especializados como os membros proteolíticos do género *Clostridium* e que conseguem obter energia suficiente para o seu crescimento com esse substrato apenas (McInerney, 1988). Os membros proteolíticos do género *Clostridium* e a estequiometria da fermentação de cada aminoácido foi recentemente revista por Ramsay e Pullammanappallil (2001). Dada a capacidade proteolítica de outras bactérias anaeróbias, Tang *et al.* (2005) estendeu a atribuição da fermentação de aminoácidos durante a digestão anaeróbia de proteínas ao filo Firmicutes. Posteriormente, foi também demonstrado que, na digestão anaeróbia termofílica de lamas activadas (maioritariamente constituídas por proteínas), 95% dos clones detectados por análise do 16S rADN pertenciam a esse filo (Kobayashi *et al.*, 2008)

Os produtos obtidos durante a fermentação de aminoácidos dependem de uma variedade de factores. Baseado no estudo de Ramsay e Pullammanappallil (2001), Batstone *et al.* (2003) calculou os produtos comuns de fermentação de proteínas em efluentes mistos como sendo, numa base de CQO, ácido acético (30%), ácido n-butírico (17-20%), ácido iso-valérico (16%), n-valérico (7-10%), hidrogénio (7%), iso-butírico (7%), ácido propiónico (5-7%) e ácido neo-valérico (4%) (não sendo, no entanto, possível distinguir os ácidos iso- e neo-valérico por métodos cromatográficos). A produção de ácido iso-valérico parece ser indicativo da ocorrência da degradação de proteínas, sobretudo de proteínas ricas no aminoácido leucina (Batstone *et al.*, 2003). No entanto, em sistemas em que se verifica a ocorrência da aceto e metanogénese, não parece ocorrer acumulação de ácido iso-valérico devido à sua conversão em metano (Gallert *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2005). Foi sugerido por Tang *et al.* (2005) que a conversão de aminoácidos em sistemas metanogénicos ocorre via sintrófica em estreita associação com os microrganismos metanogénicos hidrogenotróficos, e não através da via clássica de *Stickland*, em que é necessário um segundo aminoácido para aceitação de H₂.

Os mecanismos de desintoxicação do amoníaco (NH₃) ou do seu equivalente, ião amónio (NH₄⁺), em sistemas de digestão anaeróbia, também são dependentes da relação sintrófica que se estabelece entre os microrganismos capazes de fermentar aminoácidos e os metanogénicos hidrogenotróficos. Perante elevadas concentrações de NH₃ ou NH₄⁺, a metanogénese acetoclástica e hidrogenotrófica fica inibida, ocorrendo acumulação de ácido acético e H₂ no

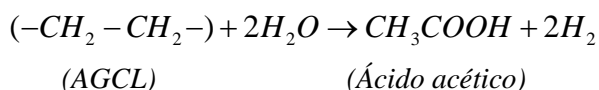
sistema. Consequentemente, a acetogénese e a desaminação dos aminoácidos a AOV's, NH_4^+ , CO_2 e H_2 ficam também inibidas (Guerrero *et al.*, 1999).

2.1.2.3 HÍDRÓLISE E β -OXIDAÇÃO DE LÍPIDOS

Os triglicéridos ou gorduras neutras são hidrolizados no meio extracelular sequencialmente a diacilgliceróis, monoacilgliceróis e, por fim, a AGCL e glicerol por lipases (Thomson *et al.*, 1999). É aceite, de uma forma geral, que a hidrólise de triglicéridos ocorre rapidamente durante a digestão anaeróbia de efluentes contendo lípidos, não sendo, por isso, considerada o passo limitante (Hanaki *et al.*, 1981; Perle *et al.*, 1995; Vidal *et al.*, 2000). A substanciar esta observação, verificou-se que a adição de microrganismos lipolíticos (Cirne *et al.*, 2006), ou a realização de um pré-tratamento de hidrólise enzimática (Masse *et al.*, 2003; Leal *et al.*, 2006), não resultou numa melhoria substancial na produção de metano a temperaturas mesofílicas no tratamento destes efluentes. No entanto, a acumulação de espumas contendo fracções lipídicas não digeridas pode ter efeitos negativos na digestão anaeróbia e, por isso, o passo de hidrólise poderá ser importante em alguns casos (Petrui e Lettinga, 1997; Rinzeema *et al.*, 1993).

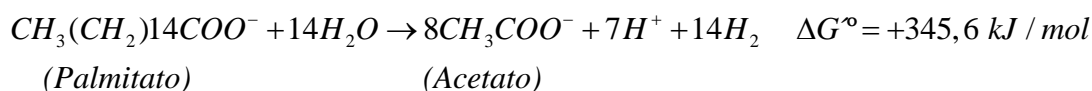
Grande parte da informação disponível sobre os microrganismos envolvidos na secreção de lipases (lipolíticos), em sistemas de tratamento de efluentes, refere-se a processos aeróbios. Segundo Cirne *et al.* (2006) *Clostridium sp.* é o género que conta com mais espécies lipolíticas existindo cerca de 10 conhecidas até essa data. Os microrganismos anaeróbios com capacidade lipolítica conhecida são: *Anaerovibrio lipolytica* (Hungate, 1966), *Anaerovibrio glycerini* (Schauder e Schink, 1989), estirpe LIP4, afiliada ao género *Propionibacterium*, estirpe LIP5 membro do cluster clostridial XIVa (Jarvis *et al.*, 1998), *Clostridium lundense* (Cirne *et al.*, 2006) e *Thermosyntropho lipolytica* (Svetlitsnyi *et al.*, 1996). Apenas duas bactérias lipolíticas foram isoladas a partir de digestores anaeróbios tratando efluentes lipídicos: a estirpe LIP1, afiliada com o cluster clostridial XIVa (Jarvis *et al.*, 1999) e a espécie *Selenomonas lipolytica* (Dighe *et al.*, 1998).

Os AGCL e glicerol obtidos com a hidrólise dos triglicéridos entram nas células dos microrganismos onde são posteriormente degradados via β -oxidação e fermentação, respectivamente (Hwu, 1997). A oxidação, no contexto dos sistemas anaeróbios, é definida como o processo em que o hidrogénio molecular é o principal aceitador de electrões, enquanto que, na fermentação, o composto em si tanto serve de aceitador como dador de electrões (Gujer e Zehnder, 1983). A via da β -oxidação foi pela primeira vez demonstrada para os AGCL por Jeris e McCarty (1965) e tem a seguinte estequiometria:



Como o único composto orgânico obtido é o ácido acético, Gunnerson e Stuckey (1986) classifica esta reacção como sendo acetogénica, ao contrário do que se verificou para os açúcares e proteínas. Além disso, esta via também é a via de oxidação durante a acetogénese dos AOV's (Hanaki *et al.*, 1981).

O H_2 é o regulador fundamental deste processo. Em termos termodinâmicos, e tal como foi descrito para a oxidação sintrófica dos principais intermediários da digestão anaeróbia, a oxidação dos AGCL é endergónica como se pode verificar na oxidação do palmitato, a título de exemplo (Hanaki *et al.*, 1981),



Como tal, os microrganismos capazes de realizar a β -oxidação de AGCL são extremamente dependentes das bactérias metanogénicas hidrogenotróficas em digestores anaeróbios (McInerney *et al.*, 1979; Gunnerson e Stuckey, 1986).

A β -oxidação é precedida por uma activação dos AGCL ao nível da membrana citoplasmática e uma hidrogenação no caso dos AGCL insaturados (Hwu, 1997; Sousa *et al.*, 2007c). As diferenças no grau de saturação e número de carbonos dos AGCL têm implicações ao nível da sua digestão anaeróbia. Segundo Angelidaki e Ahring (1995), a oxidação de AGCL contendo número par de carbonos resulta na formação de acetato, enquanto que em AGCL contendo número ímpar de carbonos resulta na formação de propionato. Os autores argumentaram que a via de oxidação foi a β -oxidação, no entanto, outros estudos revelaram que outras vias alternativas poderão ser responsáveis pela degradação de AGCL. Por exemplo, com a metanogénese inibida, Chynoweth e Mah (1971) demonstrou que a degradação de ácido oleico (18 carbonos:1 ligação dupla) resultou na formação de butirato. A adição de acetato marcado radioactivamente revelou que o butirato foi obtido a partir do acetato, e a adição de CO_2 marcado radioactivamente revelou que o acetato foi obtido a partir do CO_2 . A inibição pode ser derivada dos AGCL. Estes, podem inibir ou retardar tanto a β -oxidação como a metanogénese hidrogenotrófica (Hanaki *et al.*, 1981; Rinzema *et al.*, 1994). O efeito é tanto maior quanto a concentração e número de ligações duplas (Hanaki *et al.*, 1981; Angelidaki e Ahring, 1992). O processo de inibição poderá estar relacionado com a adsorção dos AGCL à biomassa, que é maior na presença de uma mistura de AGCL (Hwu *et al.*, 1998), tal como o seu efeito detrimental (Hanaki *et al.*, 1981)

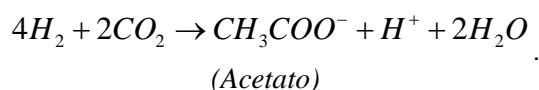
A maioria das bactérias isoladas a partir de digestores anaeróbios envolvidas na oxidação de AGCL pertence à família Syntrophomonadaceae (Roy *et al.*, 1986; Lorowitz *et al.*, 1989; Pereira *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Hatamoto *et al.*, 2007a; Hatamoto *et al.*, 2007b; Hatamoto *et al.*, 2007c; Sousa *et al.*, 2007a; Sousa *et al.*, 2007b; Sousa *et al.*, 2007c). Outros grupos de bactérias estão, no entanto, envolvidas neste processo em digestores anaeróbios como os filos Spirochaetes, Bacteroides, Firmicutes e Proteobacteria (Pereira *et al.*, 2002; Shigematsu *et al.*, 2006; Hatamoto *et al.*, 2007a; Hatamoto *et al.*, 2007b; Sousa *et al.*, 2007a). Além da família

Syntrophomonadaceae, a capacidade de oxidação de AGCL apenas foi demonstrada e reconhecida em membros da família Syntrophaceae, do filo Firmicutes (Grabowski *et al.*, 2005).

2.1.3 ACETOGÉNESE E METANOGÉNESE

A acetogénese é a ponte vital entre a hidrólise/acidogénese e a metanogénese na cadeia trófica metanogénica. A transferência de hidrogénio inter-espécies com os microrganismos metanogénicos hidrogenotróficos torna possível a realização da acetogénese (Dolfing, 1988).

Os microrganismos acetogénicos são, por definição, bactérias anaeróbias que catalizam a reacção entre duas moléculas de CO₂ a acetato durante o seu catabolismo. Esta é a via homoacetogénica clássica,



No entanto, dada a heterogeneidade do grupo, as bactérias acetogénicas podem crescer numa variedade de substratos como açúcares, monóxido de carbono (CO), compostos aromáticos e alcóois (Diekert, 2000). A via homoacetogénica pode competir com os microrganismos hidrogenotróficos pelo H₂, como foi observado durante a fase inicial da degradação do ácido butírico (Siriwongrungson *et al.*, 2007). No entanto, a capacidade de produção de H₂ e CO₂ pelos microrganismos acetogénicos pode também ser responsável pelo fluxo reverso de electrões num sistema de digestão anaeróbia. O processo foi verificado pela primeira vez durante a digestão de ácido butírico por uma co-cultura entre *Syntrophomonas wolfei* e um redutor de sulfato ou metanogénico hidrogenotrófico (McInerney *et al.*, 1979). Considerando este processo, os microrganismos fermentativos capazes de degradar os seus substratos a CO₂, H₂ e ácido acético perante determinadas condições, também podem ser considerados, nesse caso, acetogénicos, sendo-lhes atribuída a designação de bactérias redutoras de protões facultativas (Dolfing, 1988).

Os microrganismos metanogénicos pertencem ao domínio Arquea, diferente do domínio Eubacteria no qual se incluem todos os microrganismos referenciados até agora. A sua classificação num domínio separado dos eucariotas e verdadeiras bactérias assenta numa variedade de características, uma das quais a presença de coenzimas únicas envolvidas no seu metabolismo (Vogels e Keltjens, 1988). As bactérias metanogénicas obtêm a sua energia a partir da conversão de um número (nº) limitado de substratos a metano gasoso. As 83 espécies descritas até à data, dividem-se em 3 grupos tróficos, consoante a fonte de carbono, em acetotróficas (acetato), hidrogenotróficas (H₂ e HCOO⁻) e metilotróficas (compostos metilo) (Garcia *et al.*, 2000). As fontes de carbono maioritárias são H₂ + CO₂, formato e acetato. A variação da energia livre padrão de Gibbs (ΔG°') durante a maioria das reacções metanogénicas é muito baixa

e a quantidade de ATP produzida por mole de metano é provavelmente perto de 1 (Whitman *et al.*, 2000) (Tabela 2).

Tabela 2. Termodinâmica da produção de metano a partir dos diversos substratos dos microrganismos metanogénicos (Whitman *et al.*, 2000)

Reacção	ΔG° (KJ/mol de metano)
$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-135,6
$4Formato \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$	-130,1
$4(2 - Propanol) + CO_2 \rightarrow CH_4 + 4Acetona + 2H_2O$	-36,5
$2Etanol + CO_2 \rightarrow CH_4 + 4Acetona + 2H_2O$	-116,3
$Metanol + H_2 \rightarrow CH_4 + 2Acetato$	-112,5
$4Metanol \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$	-104,9
$4Metilamina + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4NH_4^+$	-75
$2Dimetilamina + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_4^+$	-73,2
$4Trimetilamina + 6H_2O \rightarrow 9CH_4 + 3CO_2 + 4NH_4^+$	-74,3
$2Dimetilsulfureto + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + H_2S$	-73,8
$Acetato \rightarrow CH_4 + CO_2$	-31

2.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA DE EFLUENTES DE LACTICÍNIOS

2.2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS EFLUENTES

O principal impacto ambiental da indústria de lacticínios é a emissão de águas residuais, produzindo-se cerca de 2-6 L de efluente/L de leite processado (RAC/CP, 2002; UNEP, 2000). Esta indústria é particularmente importante na Europa, o maior produtor mundial de produtos lácteos (Batowska *et al.*, 2009), e por essa razão, trata-se de uma das maiores fontes de efluentes industriais a nível europeu (Schneider e Topalova, 2009). No caso de Portugal, tendo em conta que, no ano de 2007, foram processados 1281 milhões de litros de leite (INE, 2008), pode-se estimar que tenham sido emitidos entre 2562 a 7686 milhões de litros de efluentes de lacticínios, por aplicação do factor acima mencionado. Se estes efluentes não forem tratados adequadamente, a qualidade das águas receptoras degrada-se, desobedecendo-se os princípios da actual Directiva-Quadro da Água, tal como foi demonstrado por Schneider e Topalova (2009).

A indústria dos lacticínios em Portugal era tradicionalmente dispersa e constituída, na maior parte dos casos, por pequenas unidades industriais próximas do produtor. Actualmente, e devido ao desenvolvimento de técnicas de armazenagem e preservação do leite fresco, concentra-se em unidades transformadores automatizadas, existentes sobretudo nas regiões Centro e

Lisboa e Vale do Tejo (INETI e IMP, 2001). Segundo os dados do Instituto Nacional de Estatística (INE) referentes ao ano de 2007, o principal produto obtido foi o leite de consumo (cerca de 72% do total), enquanto que outros produtos lácteos (natas, iogurtes, bebidas à base de leite, leite em pó, queijo, manteiga e gelados) representaram apenas uma pequena parte (INE, 2008).

Genericamente, uma unidade de transformação de leite cru produz dois tipos de águas residuais: as águas industriais e as águas usadas nos sistemas de refrigeração e condensação quando não são re-utilizadas no processo (Gutiérrez *et al.*, 1991). Estas últimas, e as águas residuais domésticas produzidas na fábrica, podem diminuir a carga orgânica das águas industriais, embora a sua influência na composição relativa do efluente seja pouca (Gutiérrez *et al.*, 1991; Omil *et al.*, 2003). A maioria das fábricas tem, no entanto, um sistema de descarga de águas domésticas directamente na rede de saneamento, enquanto que as outras águas são tratadas numa Estação de Tratamento de Águas Industriais (ETAI) construída no local (INETI e IMP, 2001; Britz *et al.*, 2006).

Em Portugal, uma unidade típica de transformação de leite cru em leite para consumo opera com recirculação das águas de refrigeração e condensação e por isso, a maior fonte de caudal nesta indústria são as águas industriais (INETI e IMP, 2001). Estas são sobretudo produzidas durante a lavagem dos equipamentos, tanques e linhas de transporte e, por isso, demonstram grandes variações horárias devido à ocorrência das operações de manutenção geralmente no final dos turnos (Samson *et al.*, 1985; Kasapgil *et al.*, 1994; Danalewich *et al.*, 1998). As águas industriais também são produzidas na fase de recepção da matéria-prima e na fase final de embalagem devido à ocorrência de derrames em ambas as fases, e eliminação de produtos defeituosos na última (INETI e IMP, 2001). Na Figura 4. apresenta-se um diagrama exemplificativo do processo. Outras contribuições são imprevisíveis como as fugas nos equipamentos ou recepção de leite cru não conforme (RAC/CP, 2002).

O caudal médio diário dos efluentes produzidos numa unidade de transformação de leite na Europa é de cerca de $500 \text{ m}^3 \cdot \text{dia}^{-1}$ (Demirel *et al.*, 2005). No entanto, além das variações horárias, o caudal de efluentes também varia consoante os dias da semana e as estações do ano (Danalewich *et al.*, 1998), bem como com o tipo de produtos fabricados, os métodos de operação e as quantidades de leite transformado (RAC/CP, 2002; Britz *et al.*, 2006).

Em termos qualitativos, os efluentes de lacticínios apresentam o que se considera uma carga orgânica média a elevada de cerca de $5500 \text{ mg CQO} \cdot \text{L}^{-1}$ (Carawan *et al.*, 1979; Cordoba *et al.*, 1984; Driessen e Yspeert, 1999; Hu *et al.*, 2002). Tendo em conta este valor médio, pode-se estimar que foram emitidas, no ano de 2007, entre 12,81 a 38,43 mil toneladas de CQO devido à indústria de lacticínios em Portugal. Também podem ser usados outros valores para esta estimativa, como a emissão de cerca de 8 Kg de CQO/L de leite recepcionado nas fábricas de lacticínios (UNEP, 2000).

Cerca de 90% da matéria orgânica nos efluentes deve-se à presença dos componentes do leite, enquanto que os restantes 10% atribuem-se ao uso de detergentes, corantes e estabilizadores consoante o processo e tipo de produto obtido (RAC/CP, 2002). Nas unidades

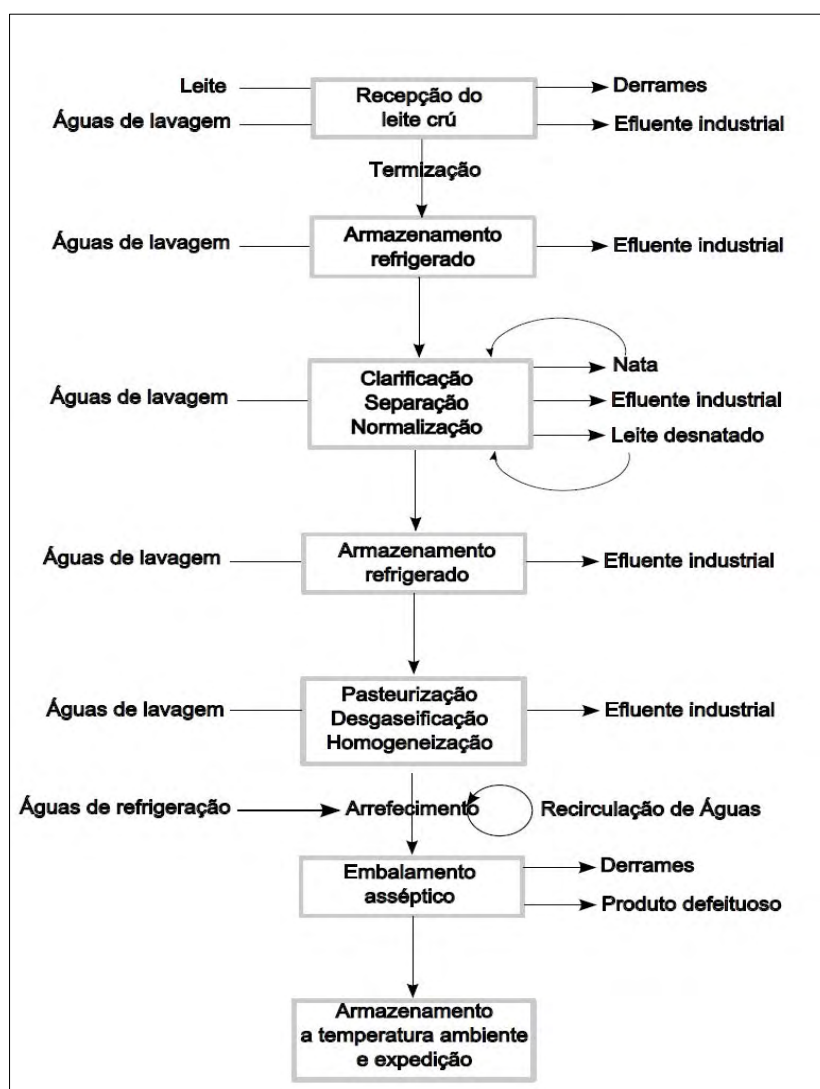


Figura 4. Diagrama exemplificativo das operações numa unidade típica de transformação de leite cru em leite para consumo e respectivos consumos e emissões de efluentes industriais (adaptado de (INETI e IMP, 2001).

onde é produzido queijo importa ainda salientar a contribuição do soro de leite na carga orgânica volúmica (Bv) dos efluentes como está exemplificado na Tabela 3.

Tabela 3. Contribuição dos diferentes produtos para a carga orgânica do efluente emitido numa fábrica de lacticínios com multi-produtos (Öztürk *et al.*, 1993).

Produto	Volume de produção (%)	Águas residuais		
		CQO (mg.L ⁻¹)	Q (%)	Bv (%)
Leite para consumo	91	950-1'200	88	18
logurte	8,5	350-900	4	0,5
Manteiga	0,47	20'000-52'000	1	8,5
Queijo	0,04	18'000-70'000	7	73

O leite, e por sua vez, os efluentes de laticínios, são constituídos por compostos orgânicos como os açúcares (sobretudo lactose), proteínas (das quais a caseína é a mais abundante) e lípidos (sobretudo triglicéridos) (Gomes *et al.*, 2008). O soro de leite tem a particularidade de apresentar uma menor proporção lipídica (Fang, 1991). A presença destes constituintes é a razão para o facto dos efluentes de laticínios serem considerados efluentes complexos (Danalewich *et al.*, 1998; Haridas *et al.*, 2005), e facilmente biodegradáveis com uma razão CBO₅/CQO entre 0,53-0,81 em fábricas com multi-produtos (Duarte e Oliveira, 1984; Öztürk *et al.*, 1993; Danalewich *et al.*, 1998; Passeggi *et al.*, 2009). Também estão presentes outros componentes como os sais minerais, vitaminas, etc. (Gomes *et al.*, 2008).

A Tabela 4. sumariza alguns exemplos das principais características dos efluentes de laticínios. É importante realçar o facto do pH ser geralmente neutro a alcalino, embora este possa variar bastante com o tipo de químicos usados nas lavagens (Danalewich *et al.*, 1998). A presença de lactose nos efluentes pode ainda sofrer uma acidificação a ácido láctico que ocorre descendo o pH e induzindo a precipitação da caseína. Por este motivo, existe muitas vezes um valor elevado em sólidos suspensos totais nestes efluentes (Gutiérrez *et al.*, 1991). Alguns autores adicionam azoto (N) e fósforo (P) aos efluentes de laticínios para a realização de ensaios laboratoriais com uma razão CQO:N:P adequada para a sua digestão anaeróbia (Goodwin *et al.*, 1990; Hawkes *et al.*, 1995), enquanto que outros consideram que os nutrientes presentes são suficientes para uma digestão anaeróbia sem deficiências (Backman *et al.*, 1985). Estes efluentes podem apresentar AOV's, sendo o mais comum o ácido acético (Borja e Banks, 1995; Danalewich *et al.*, 1998).

Quanto à composição orgânica, os açúcares são os mais abundantes seguidos dos lípidos e das proteínas tanto no leite cru, como nos efluentes de gelados. Noutros estudos usando efluentes sintéticos (Backman *et al.*, 1985; Zeeman *et al.*, 1997), ou águas residuais de um laboratório de análises de leite (Omil *et al.*, 2003), também se verificou esta proporção. O soro apresenta como já foi referido, um défice na proporção lipídica, embora apresente no global mais gorduras devido à elevada CQO que caracteriza esta corrente. A lactose é o componente orgânico mais comum destes efluentes. Trata-se de um dissacarídeo solúvel de glucose e galactose. Também existem pequenas quantidades destes monómeros, bem como outros hidratos de carbono na composição do leite, embora em quantidades vestigiais (Newburg e Neubauer, 1995). As caseínas (α -, β -, κ - e γ -) constituem 80% do total de proteínas e encontram-se geralmente organizadas na forma de micelas o que lhes confere uma estrutura estável (Gomes *et al.*, 2008; Jean-Luc *et al.*, 2003). Outras proteínas são designadas como as proteínas solúveis ou do lactosoro (β -lactoglobulina, α -lactalbumina, imunoglobulinas e albumina sérica) e têm uma configuração globular (Gomes *et al.*, 2008). Os triglicéridos do leite constituem 98% dos lípidos presentes, sendo que os esteróis, fosfolípidos e outros representam apenas uma pequena parte do total. Os triglicéridos formam o interior do que se designa de glóbulo de gordura do leite e que é revestido por uma membrana de lípidos complexos que tornam a gordura compatível com o seu ambiente aquoso. Uma compilação dos ácidos gordos presentes na constituição dos triglicéridos do leite já listou mais de 400 (Christie, 1994). No geral, os ácidos gordos mais importantes são o

palmítico (16:0) (29,53%), oleico (18:1) (27,39%), mirístico (14:0) (11,41%) e esteárico (18:0) (9,84%) (Jensen e Newburg, 1995).

Tabela 4. Exemplos das principais características dos efluentes de laticínios e sua comparação com o leite cru.

Parâmetro	Unidades	Fábricas de multi-produtos ^a	Fábrica de gelados ^b	Fábrica de leite de consumo ^c	Fábrica de queijo ^d	Fábrica de queijo com recuperação do soro ^e	Leite cru ^a
CQO	mg.L ⁻¹	2855	5200	3383	61000	2926	150000
N-total	mg.L ⁻¹	-	-	-	-	36	7200
N-Kjehdal	mg.L ⁻¹	91,4	-	51	826	-	-
N-NH ₄ ⁺	mg.L ⁻¹	-	15	-	-	-	-
P-total	mg.L ⁻¹	71	-	22	240	21	1000
P-PO ₄ ³⁻	mg.L ⁻¹	-	14	-	-	-	-
pH	-	8,4	5,1	7,9	6	6,7	7
Alcalinidade	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	652	220	-	480	581	200
ST	mg.L ⁻¹	4545	3900	-	-	2750	125000
SST	mg.L ⁻¹	976	3100	831	6770	-	-
SV	mg.L ⁻¹	2790	2600	-	-	1880	117000
SSV	mg.L ⁻¹	703	2100	746	6270	-	-
AOV's	mg Ac.L ⁻¹	147	185	-	nd	218,5	nd
Gorduras	% (m/v)	-	0,063	0,0263	0,1	0,0294	4
Proteínas	% (m/v)	-	0,033	-	0,468	-	3
Açúcares	% (m/v)	-	0,21	-	3,8	-	5

a (Danalewich *et al.*, 1998)

b (Borja e Banks, 1995)

c (Tawfik *et al.*, 2008)

d (Antonopoulou *et al.*, 2008)

e (Gutiérrez *et al.*, 1991)

nd, não detectado; -, não determinado.

2.2.2 ESTADO DA ARTE NO USO DE REACTORES UASB NO TRATAMENTO DE EFLUENTES DE LACTICÍNIOS

O reactor UASB foi desenvolvido em 1971 pelo grupo de investigação de Gatze Lettinga na Holanda. Este reactor caracteriza-se por três princípios de funcionamento básicos. O primeiro consiste na obtenção de lamas com uma elevada capacidade de sedimentação perante condições ambientais favoráveis e, por isso, não é necessário ter um sistema de recirculação de lamas para a manutenção de biomassa activa no digestor. O segundo princípio consiste na realização de uma agitação natural que ocorre devido à produção de biogás, não sendo necessário um sistema de

agitação mecânica para melhorar o contacto entre a biomassa e o substrato. Por fim, a existência de um separador gás-sólido-líquido favorece a sedimentação das lamas e a obtenção de um efluente praticamente livre de sólidos (Lettinga *et al.*, 1980).

O processo de obtenção de lamas com elevada capacidade de sedimentação designa-se por granulação. Esta é uma forma de imobilização natural dos microrganismos num agregado com uma forma definida e um diâmetro que pode variar entre 0,14 a 5 mm, designado por grânulo (Schmidt e Ahring, 1996). Muitos são os factores que afectam a granulação em reactores UASB. A presença de iões cálcio (Mahoney *et al.*, 1987) e outros nutrientes (Vlyssides *et al.*, 2009), a produção de exopolímeros (MacLeod *et al.*, 1995), a CQO do influente (Morvai *et al.*, 1990; Tay e Yan, 1996), o tipo de substrato (Grotenhuis *et al.*, 1991), os parâmetros hidráulicos de operação do reactor (Francese *et al.*, 1998; Guiot *et al.*, 1991), a agitação induzida pela produção de biogás (Bhunia e Ghangrekar, 2008), para nomear alguns. Este processo é crítico no estabelecimento de um tratamento eficiente e, por isso, o arranque de reactores UASB deve satisfazer certas condições para o desenvolvimento de lamas granulares (Lettinga *et al.*, 1980). Segundo Singh *et al.* (1998), o arranque deverá demorar entre 4-8 meses de forma a que essas condições sejam satisfeitas.

No interior do reactor formam-se três zonas distintas. Os grânulos depositam-se na base, por onde é fornecido o influente, na zona do leito de lamas. É aí que se verifica a maior concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV). Acima desta, a zona do manto de lamas forma-se com o rebentamento e flutuação de grânulos devido à produção de biogás, e portanto caracteriza-se por uma menor concentração de SSV. A biomassa do manto de lamas poderá estar na forma de grânulos, flocos ou microrganismos dispersos. No topo do reactor, as lamas sedimentam devido à presença do separador gás-sólido-líquido e por isso essa zona designa-se por zona de sedimentação (Lettinga *et al.*, 1980; Borja e Banks, 1994; Rajeshwari *et al.*, 2000). Um diagrama exemplificativo encontra-se na Figura 5.

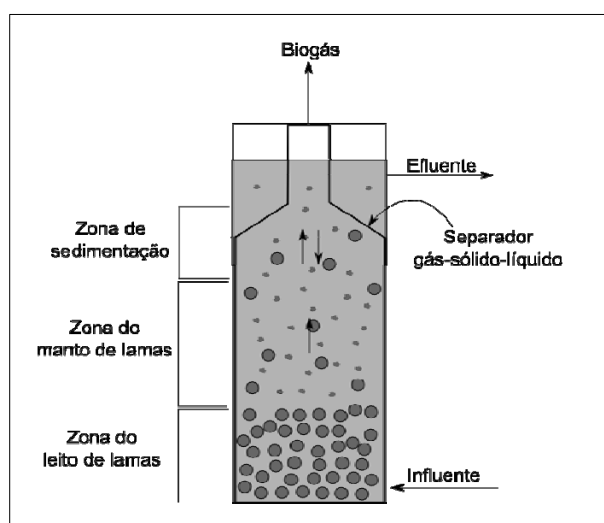


Figura 5. Diagrama exemplificativo do reactor UASB e respectivas zonas que se criam no seu interior

Os princípios de funcionamento do reactor UASB reflectem-se num elevado tempo de retenção de sólidos (TRS) e que torna possível o tratamento de efluentes com uma CQO elevada a tempos de retenção hidráulicos (TRH) particularmente curtos (0,2-2 dias). Dependendo do tipo de influente, este reactor pode ser operado a Bv's entre 2 a 25 Kg CQO.m⁻³.dia⁻¹ (Wiesmann *et al.*, 2007). Trata-se, por isso, de um sistema de tratamento anaeróbio de alta carga com a vantagem de ter poucos requisitos de espaço e a vantagem adicional de ter um funcionamento mais simples e rentável comparativamente com outros sistema deste tipo (Bal e Dhagat, 2001; Tawfik *et al.*, 2008). Assim se justifica que o sistema UASB seja o mais bem sucedido na implementação a larga-escala em todo o mundo (Seghezze *et al.*, 1998; Banu *et al.*, 2007). Em 1991, existiam cerca de 250 sistemas dos quais 6 eram usados no tratamento de efluentes de lacticínios (Lettinga e Hulshoff-Pol, 1991). Em 1998, existiam cerca de 790, representando 65% do total de instalações anaeróbias em todo o mundo (Fang e Liu, 2001).

A primeira aplicação do reactor UASB ao tratamento de efluentes de lacticínios foi testada em 1974 com um efluente sintético preparado por diluição de leite magro comercial (Lettinga *et al.*, 1980). Desde então, vários foram os estudos referentes a esta aplicação. A Tabela 5 resume os principais.

De uma forma geral, os reactores UASB usados no tratamento de efluentes de lacticínios operam a temperaturas mesofílicas (30-37°C). Esta questão prende-se com o facto da temperatura dos efluentes de lacticínios ser de morna a quente, entre 19-34°C (Van den Berg e Kennedy, 1983; Filho *et al.*, 1996; Rajeshkumar e Jayacheran, 2004; Passeggi *et al.*, 2009), e por isso, os estudos à escala laboratorial foram realizados na sua gama superior. Nos casos em que não foi realizado controlo de temperatura, os reactores operaram a 20-30°C (Kalyuzhnyi *et al.*, 1997; Passeggi *et al.*, 2009; Saléh *et al.*, 2009), excepto no estudo de Luostarinen e Rintala (2005) em que operaram a uma temperatura de 15°C. A informação referente ao uso de reactores UASB no tratamento de efluentes de lacticínios na gama termofílica refere-se a reactores acidogénicos (Yu e Fang, 2000; Yu e Fang, 2001; Yu *et al.*, 2002), não tendo sido incluídos na Tabela 5.

Os principais avanços nesta tecnologia referem-se à optimização dos parâmetros de operação para a obtenção de um tratamento estável através do estudo da Bv máxima após a qual se verifique a falha do reactor ou até à qual a eficiência de remoção da CQO seja superior a 90%. Usando um efluente sintético preparado por dissolução de leite em pó, sacarose, nutrientes e alcalinidade, Fang e Chui (1993) demonstrou ser possível operar reactores UASB com este efluente até a uma Bv de 160 Kg CQO.m⁻³.dia⁻¹. No entanto, a eficiência de remoção da CQO e a produtividade em metano mais elevadas verificaram-se para as cargas mais baixas usadas neste estudo.

As razões para a diminuição do desempenho dos digestores anaeróbios tratando efluentes de lacticínios a elevada Bv devem-se, nomeadamente, à presença da lactose, o componente mais facilmente biodegradável do leite, e que tende a acidificar o reactor devido à sua rápida transformação em AOV's baixando o pH a níveis que inibem a metanogénese (Zeeman *et*

Tabela 5. Resumo dos principais parâmetros de operação de reactores UASB e tipo-UASB usados no tratamento de efluentes de lacticínios.

Reactor tipo-UASB	Nº de estádios	Temperatura (°C)	Volume do Reactor (L)	Origem das Lamas/Tipo de lamas iniciais	Origem do efluente	C _{in} (g.L ⁻¹)	Q (L.dia ⁻¹)	TRH (dias)	Bv (g CQO.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Eficiência remoção da CQO (%)	Produção de biogás (L biogás.dia ⁻¹)	% metano no biogás	Produção de metano (L CH ₄ .dia ⁻¹)	Produtividade em metano (LCH ₄ .g CQO ⁻¹ .dia ⁻¹)	Referência
Típico	1	30	18	-	Leite magro comercial	35-40	3,6	5	7-8	90	-	-	-	-	(Lettinga <i>et al.</i> , 1980)
Com RL	1	30	6	Do reactor em uso	Fábrica de lacticínios com RS	4	7,5	0,8	5	85	-	-	9,6	0,38 ^a	(Van den Berg e Kennedy, 1983)
							22,2	0,27	15	73	-	-	28,8	0,44 ^a	
Típico	1	30	400'000	Lamas granulares	Fábrica de queijo	3,33	900'000	0,44	7,5	85	1'000'000	80	800'000	0,27 ^a	(Samson <i>et al.</i> , 1985)
Típico	-	-	-	-	Soro de leite desproteinado	11	-	1,5	7,1	94	-	-	-	-	(Schroder e Dehaast, 1989)
Típico	1	-	17,5	-	Soro de leite	5-28,7	3,5	5	1-5,7	97-99	-	-	-	-	(Yan <i>et al.</i> , 1989)
Típico	1	35	0,75	Digestor Municipal	Gelado comercial	1,755	1	0,75	2,3	86	2,5	44	1,1	0,73 ^a	(Goodwin <i>et al.</i> , 1990) ^b
Típico	1	35	2,5	Digestor Municipal	Leite comercial	10	1	2,5	4	87	4	60	2,4	0,28 ^a	(Shin e Paik, 1990)
Com RE	2	35	1 – 1 2 – 1	Digestor de soro de leite	Soro de leite	60	1 – 0,5 2 – 0,3	5	30*	99	-	-	7,5	0,25 ^a	(García <i>et al.</i> , 1991)
Típico	1	-	-	-	Permeado de soro de leite	10,4	-	0,4-5	-	64,2-99	-	-	-	-	(Hwang <i>et al.</i> , 1992)
Típico	1	35	4	Digestor de efluentes de beterraba	Fábrica de queijo	1,77	11,1	0,36	4,9	97	7,5	84	6,3	0,33 ^a	(Gutiérrez <i>et al.</i> , 1991)
Típico	1	35	8,5	Digestor Municipal	Leite em pó comercial	6-12	25-111,1	0,075-0,33	18-84	70-90	67,5-277,6	49-63	42,5-136	0,28-0,32 ^a	(Fang e Chui, 1993) ^c
Híbrido	1	35	8,1	UASB doméstico	Fábrica de lacticínios	1,07	38	0,21	5	76	10	75 ^d	7,5	0,25 ^a	(Öztürk <i>et al.</i> , 1993)
					Leite magro comercial	2,57	23	0,35	7,1	87	23,4		17,6	0,34 ^a	
					Soro de leite	6	11	0,74	8,5	87	27,5		20,6	0,35 ^a	
Típico	1	35	6,2	UASB de efluentes de cerveja e lacticínios	Fábrica de gelados	5,2	3,1	2	2,6	96,9	8,2	69,5	5,7	0,37 ^a	(Borja e Banks, 1994)
Com SSP	2	35	1 – 118 2 – 30	Lamas granulares	Soro de leite pré-tratado	35,2	1 – 84,7 2 – 89,8	1,72	25,3*	-	1 – 41,8 2 – 143,8	1 – 26,6 2 – 82,7	1 – 11,1 2 – 118,9	0,04 ^a	(Cohen <i>et al.</i> , 1994)
Típico	1	37	8,5	Digestor Municipal	Leite em pó comercial	6	25,5	0,33	18	97	81	-	-	-	(Fang e Chui, 1994)
Híbrido						6	25,5	0,33	18	97	89	-	-	-	
Híbrido	1	30	3	Digestor Municipal	Soro de leite	1,82	3	1	1,8	95,8	2,45	70,5	1,73	0,33 ^a	(Cordoba <i>et al.</i> , 1995)
Típico	1	35	525	Digestor de efluentes de creme de leite	Gelado comercial	3,55	324	1,62	2,19	49	153,2	69,6	107,1	0,19 ^a	(Hawkes <i>et al.</i> , 1995)
Típico	1	35	3,6	Lagoa anaeróbia de matadouro	Fábrica de queijo	5-77	0,31-1,6	2,3-11,6	1-28,5	95-99	-	-	-	-	(Kalyuzhnyi <i>et al.</i> , 1997)
		20-29	12'000			16-50	1000-3333	3,3-12,8	1-6,7	90-95	-	-	-	-	
Híbrido	2º	35	5	Digestor híbrido tratando efluentes de lacticínios sintéticos	Fábrica de queijo	5,36	2,63	1,9	2,82	97	7,45	66	4,92	0,359 ^a	(Strýdom e Mostert, 1997)
					Fábrica de leite para consumo	4,64			2,44	94	5,42	69,3	3,76	0,327 ^a	

(Continuação da Tabela anterior)

Reactor tipo-UASB	Nº de estádios	Temperatura (°C)	Volume do Reactor (L)	Origem das Lamas/Tipo de lamas iniciais	Origem do efluente	C _{in} (g.L ⁻¹)	Q (L.dia ⁻¹)	TRH (dias)	Bv (g CQO.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Eficiência remoção da CQO (%)	Produção de biogás (L biogás.dia ⁻¹)	% metano no biogás	Produção de metano (L CH ₄ .dia ⁻¹)	Produtividade em metano (LCH ₄ .g CQO ⁻¹ .dia ⁻¹)	Referência
Híbrido	2º	35	5	Digestor híbrido tratando efluentes de laticínios sintéticos	Fábrica de leite em pó e manteiga	1,84	2,63	1,9	0,97	91	1,56	80,7	1,26	0,287 ^a	(Strydom e Mostert, 1997)
Com CI	1	-	400'000	-	Fábrica de leite em pó e leite condensado	1,55	2,4-3,6.10 ⁸	0,11-0,17	7,5-24	51	-	-	-	-	(Driessen e Yspeert, 1999) ^e
Típico	1	35	10	Digestor de efluentes de laticínios	Fábrica de queijo	37	1,7	6	6,3	98	43	71	30,5	0,5 ^a	(Gavala <i>et al.</i> , 1999)
Típico	2	35	1 – 0,743 2 – 0,51	Digestor de efluentes de cerveja	Fábrica de queijo	59,6	1 - 0,2-0,4 2 – 0,2-0,3	3,82-8,45	10,4-24,6*	96-97	-	-	-	-	(Erguder <i>et al.</i> , 2001)
Típico	1	30	-	Chorume digerido	Leite em pó comercial	-	-	0,125	10,8	95,6	-	-	-	-	(Ramasamy <i>et al.</i> , 2004)
				UASB de efluentes de açúcar						96,3	-	-	-	-	
Interm	1	5	6	Digestor de efluentes de laticínios	Leite meio-gordo comercial	2,5-12,48	12	0,5	2,5-12,48	59-98	-	-	3,1-21,3	0,26-0,35 ^a	(Nadaiš <i>et al.</i> , 2006)
Típico						1,25-6,24				53-99	-	-	2,47-19,9	0,25-0,31 ^a	
Tanque séptico-UASB	2	15	1 -12 2 - 3	Digestor Municipal	Águas de lavagens de recolha de leite	0,554	1 – 3,17 2 – 1,9	5,4	0,15*	86	-	-	-	-	(Luostarinen e Rintala, 2005)
Híbrido	2	Mesofílico	1 – 5,6 2 – 5,9	Chorume digerido	Efluente de laticínios sintético	2,5-4,5	1 – 24 2 - 24	0,5	10,7-19,2*	98	11,2-19,6	1 – 67-70 2 – 63-66	7,5-13,6	0,127-0,135 ^a	(Banu <i>et al.</i> , 2007)
Típico	1	35	10	UASB de efluentes de laticínios	Leite em pó comercial	4	10	1	4	79,4	-	-	-	-	(Jedrzejewska-Cicinska <i>et al.</i> , 2007)
Híbrido			2				2	1	4	86,5	-	-	-	-	
Típico	1	20	5	Digestor Municipal	Fábrica de leite com efluente doméstico	3,4 ± 1,345	5	1	1,9-4,4	69	-	-	-	-	(Tawfik <i>et al.</i> , 2008)
Com SIG	1	20-30	40'000	Lagoa anaeróbia de matadouro	Cooperativa de laticínios	3,9	56'497	0,7	5,5	90	-	-	-	-	(Passeggi <i>et al.</i> , 2009)
Típico	1	25	394	-	Fábrica de laticínios	2,33	267	1,5	1,6	93,5	-	-	-	-	(Saléh <i>et al.</i> , 2009)

^a refere-se a g CQO removida; ^b valores calculados em função do carbono orgânico total (COT); ^c só se considerou os valores referentes à CQO total; ^d valor médio; ^e CQO fornecida
 RL – Recirculação de lamas; RS – Recuperação de soro de leite; RE – Recirculação do efluente; SSP – Substrate Shuttle Process; CI – circulador interno; Interm – Modo de operação intermitente; SIG – Separador Interno de Gorduras

* no primeiro reactor

al., 1997; Yu e Fang, 2002). Outra possível razão é a acumulação dos AGCL resultantes da hidrólise dos triglicéridos do leite por mecanismos de adsorção à biomassa (Petruy e Lettinga, 1997; Hwu *et al.*, 1998), e que se traduz na inibição da metanogénese (Hanaki *et al.*, 1981; Koster e Cramer, 1987; Rinzema *et al.*, 1994; Passeggi *et al.*, 2009), bem como na diminuição da densidade das lamas, flotação e consequente *washout* (Perle *et al.*, 1995; Hwu *et al.*, 1998). Outro motivo para a flotação e *washout* no tratamento de efluentes de lacticínios é a produção de polímeros extracelulares pela biomassa e que é favorecida pela presença de lactose no influente. Este fenómeno modifica a razão superfície/volume dos agregados que, aliada à produção de biogás, justifica a tendência para o *washout* em efluentes de lacticínios ricos em hidratos de carbono (Vidal *et al.*, 2000). A limpeza periódica destes exopolímeros é difícil e reduz a eficiência do tratamento (Fuzzato *et al.*, 2009). A flotação é um fenómeno a evitar não só porque pode resultar em *washout* como também é responsável pelo *sludge bulking* e formação de escumas ou espumas na zona do separador gás-sólido-líquido entupindo-se a saída do biogás (Öztürk *et al.*, 1993).

Dadas as dificuldades que revestem a digestão anaeróbia de efluentes de lacticínios, compreende-se a necessidade de optimização do processo. No caso do reactor UASB, apesar das elevadas eficiências de remoção da CQO obtidas (Tabela 5), várias modificações no modo de operação foram já testadas.

A separação de fases é uma estratégia que consiste na realização da fase acidogénica num primeiro digestor de cultura mista ou de espécies seleccionadas pela sua capacidade acidogénica, ao qual se segue um segundo digestor onde são convertidos os produtos do primeiro a metano (Aivasidis e Diamantis, 2005). Esta estratégia é vantajosa no tratamento de efluentes com elevada CQO porque permite a regulação do pH para a realização de uma fase metanogénica em condições óptimas (Ke *et al.*, 2005). Segundo Garcia *et al.* (1991), a recirculação do efluente obtido no tratamento de soro de leite em reactores UASB de duas fases tornou, no entanto, o sistema auto-suficiente no que se refere à regulação de pH e à adição de alcalinidade. A utilização da separação de fases nesse estudo permitiu satisfazer os requisitos de legislação da CQO à saída, sem ser necessário tratamento posterior. O conceito de *Substrate Shuttle Process* (SSP) utilizado por Cohen *et al.* (1994) no tratamento de soro de leite consiste numa separação química entre dois reactores UASB através do uso de resinas de troca aniónica. Foi demonstrado ser possível o uso prolongado das resinas com fornecimento de N₂ para a libertação dos AOV's em ciclos de 5 horas. No entanto, as causas para a baixa produtividade em metano calculada para o sistema não foram ainda resolvidas. A separação de fases poderá não ocorrer necessariamente em digestores contíguos (deGooijer *et al.*, 1996). Segundo Erguder *et al.* (2001), o tratamento do efluente de uma fábrica de queijo, com elevada carga orgânica (e que supõe a inexistência de processos de recuperação de soro), em reactores UASB com dois estádios funcionou como reactores em série para a remoção da CQO. No primeiro, a eficiência de remoção variou entre 92-97% e no segundo entre 27-60% em função da Bv aplicada. No global, obteve-se uma eficiência de remoção de 96-97%. Como os requisitos de legislação da CQO à

saída do sistema não foram satisfeitos, o autor sugeriu a realização de apenas um estágio ou dos dois estágios com um passo adicional de lamas activadas para o cumprimento desses requisitos. Outros autores, obtiveram eficiências de remoção semelhantes no tratamento de soro de leite em reactores UASB com apenas um estágio (Yan *et al.*, 1989; Hwang *et al.*, 1992). No entanto, a CQO do influente foi bastante inferior à testada nos reactores UASB de duas fases referidos atrás.

Os reactores UASB-híbridos (UASBH) são reactores UASB contendo algum tipo de enchimento no topo e que ocupa geralmente cerca de 25-30% do seu volume (Banu *et al.*, 2007). Assim, combinam as vantagens do reactor UASB com as do Filtro Anaeróbio (FA), nomeadamente a formação de grânulos com boa sedimentabilidade e a redução do *washout* perante cargas orgânicas elevadas (Kennedy e Guiot, 1986; Kalyuzhnyi *et al.*, 1997). Usando efluente sintético preparado por dissolução de leite em pó, sacarose, nutrientes e alcalinidade, Fang e Chui (1994) obtiveram a mesma eficiência de remoção da CQO (97%) em UASB e UASBH operados a uma Bv de 18 Kg CQO.m⁻³.dia⁻¹. Esta elevada eficiência foi atribuída à formação de grânulos com boa sedimentabilidade. Quanto à produção de biogás, que se verificou ser cerca de 10% superior no reactor híbrido, poderá ter estado relacionada com a degradação de SS e com a respiração endógena da biomassa retida no filtro. Durante o arranque, o reactor UASB foi, no entanto, superior no que se referiu à retenção de lamas e eficiência de tratamento. Um reactor UASBH com um novo *design* foi desenvolvido por Jedrzejewska-Cicinska *et al.* (2007). Este tem a particularidade de estar inclinado com um ângulo de 30° com melhorias ao nível da sedimentabilidade das lamas. Usando leite em pó dissolvido, obteve-se eficiências de remoção da CQO cerca de 7% superiores relativamente a um reactor UASB típico, a uma Bv de 4 Kg CQO.m⁻³.dia⁻¹. O efluente produzido tinha menos 212 mg SS.L⁻¹ que o reactor UASB típico. O tratamento de diferentes efluentes de laticínios em reactores UASBH foi comparada por Öztürk *et al.* (1993) e Strydom e Mostert (1997). Da análise dos parâmetros operacionais da Tabela 5, podemos concluir que foram obtidas eficiências de remoção da CQO (87%) e produtividades em metano (0,34 e 0,35 LCH₄.gCQO_{removida}.dia⁻¹) elevadas no tratamento de leite magro ou soro de leite sintéticos a uma Bv de 8,5 e 7 Kg CQO.m⁻³.dia⁻¹, respectivamente. O desempenho do mesmo reactor no tratamento de efluentes reais de uma fábrica de laticínios foi inferior, mas a Bv usada também (Öztürk *et al.*, 1993). Noutro estudo referente ao tratamento de soro de leite sintético num reactor UASBH foi também obtida uma elevada produtividade em metano (0,33 LCH₄.gCQO_{removida}.dia⁻¹), embora a uma Bv mais baixa de 1,8 Kg CQO.m⁻³.dia⁻¹. Neste estudo, a produtividade em metano diminuiu a cargas orgânicas volúmicas superiores (Cordoba *et al.*, 1995). O tratamento de efluentes de uma fábrica de queijo e de uma fábrica de leite num reactor UASBH, com pré-acidificação, obteve elevadas eficiências de remoção da CQO (94-97%) e produtividades em metano (0,36 e 0,33 LCH₄.gCQO_{removida}.dia⁻¹). Quando foi usado efluente de uma fábrica de leite em pó e manteiga pré-acidificado, o desempenho diminuiu devido à presença de menores quantidades de açúcares fermentáveis e que resultou numa fraca pré-acidificação (Strydom e Mostert, 1997). No estudo de Banu *et al.* (2007), foram usados dois reactores UASBH em série no tratamento de efluentes de laticínios sintéticos. A produtividade em metano foi

bastante baixa devido à sua base de cálculo ser o sistema global. No entanto, segundo os autores, o processo pode ser uma alternativa aos sistemas anaeróbios/aeróbios convencionais.

A recirculação de lamas não é obrigatória para o bom funcionamento do reactor UASB. No entanto, devido aos problemas de *sludge bulking* e acumulação de escumas e espumas no topo do reactor durante cargas orgânicas elevadas de efluentes de lacticínios, a sua utilização foi incluída por Van den Berg e Kennedy (1983) num reactor UASB à escala laboratorial e sugerida por Öztürk *et al.* (1993) para implementação à escala real. Outra alternativa ao reactor UASB típico é, por exemplo, a introdução de um separador interno de gorduras (SIG) no reactor, de forma a não ser necessário realizar o passo de flotação de ar dissolvido (FAD), previamente à digestão destes efluentes em ETAI's (Passeggi *et al.*, 2009). Segundo os autores, foi possível operar de forma estável mesmo quando as gorduras do influente equivaleram a cerca de 40% da CQO total. Nesse estudo, o uso de um sedimentador lamelar a jusante do reactor UASB, revelou-se inútil a partir do momento em que ocorreu a granulação das lamas.

A tecnologia de circulação interna (CI) foi desenvolvida por Driessen e Yspeert (1999) e consiste em dois compartimentos UASB topo a topo, sendo o primeiro operado a alta carga e o segundo a média-baixa carga. O sistema permite a separação do biogás em dois estádios e uma circulação interna do efluente derivada da produção de biogás. O primeiro separador separa biogás e água enquanto que o segundo pode assim separar efectivamente a biomassa do efluente tratado sem a interferência das elevadas velocidades de ascensão do biogás. A baixa eficiência de remoção da CQO total (51%) no tratamento de efluentes de uma fábrica de leite para lactentes e leite condensado à escala real, com este sistema, poderá ser atribuída à baixa CQO do influente. No entanto, e apesar de não serem apresentados valores de produção de metano, a metanogénese parece ter ocorrido de forma completa uma vez que não se verificaram AOV's à saída do sistema.

O sistema UASB-tanque séptico foi pela primeira vez aplicado ao tratamento de efluentes de lacticínios por Luostarinen e Rintala (2005) e foi usado com a tecnologia de separação de fases. De uma forma geral, o reactor UASB-tanque séptico consiste num tanque séptico tradicional modificado pela entrada do efluente através da base o que induz um fluxo ascendente do efluente, tal como no reactor UASB. A digestão dos efluentes produzidos durante a lavagem de equipamentos de recolha de leite com este sistema verificou uma eficiência de remoção da CQO de 86%. A tentativa de conciliação de diferentes tecnologias com o modo de funcionamento do reactor UASB também foi investigada por Monroy *et al.* (1995). Este autor modificou o funcionamento de uma lagoa anaeróbia existente numa fábrica de lacticínios no México com a entrada do efluente pela base através da instalação de caixas e tubos de distribuição na referida lagoa. Este estudo não foi incluído na Tabela 5, porque não se trata de um sistema fechado e portanto não foi considerado como um digestor tipo-UASB.

O modo de funcionamento intermitente foi desenvolvido por Nadais (2002) e consiste no fornecimento do efluente ao reactor durante uma primeira fase, a fase de alimentação, seguida de uma fase de estabilização durante a qual o efluente é recirculado. Estudos de optimização

demonstraram que o ciclo de 48h de alimentação seguidos de 48 horas de recirculação é o ideal no tratamento de efluentes de laticínios com este modo de operação (Nadais *et al.*, 2005). De forma a poder ser comparado com o reactor UASB típico (modo de funcionamento contínuo) é necessário fornecer o dobro da CQO do influente durante a fase de alimentação, para que no global a Bv seja igual nos reactores em estudo, para as mesmas condições de caudal e tempo de retenção hidráulico na fase de alimentação. O reactor UASB intermitente apresenta eficiências de remoção da CQO elevadas, $\geq 87\%$ a partir de $3,26 \text{ Kg CQO.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$, enquanto que no reactor contínuo estas eficiências apenas são obtidas a partir de $12,48 \text{ Kg CQO.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$. A vantagem do reactor UASB intermitente também reside ao nível da produtividade em metano, sendo superior mesmo a diferentes Bv's (Nadais *et al.*, 2006) (Tabela 5). Além disso, o sistema consegue suportar uma Bv máxima elevada de $22 \text{ Kg CQO.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ sem problemas de estabilidade (Nadais *et al.*, 2005). Foi sugerido por Nadais (2002), que este modo de operação induz uma adaptação forçada aos substratos complexos do leite (proteínas e gorduras) e que não são facilmente degradados durante a fase de alimentação devido à degradação preferencial da lactose nessa fase.

3

OBJECTIVOS

Os objectivos deste trabalho foram referidos, em termos gerais, no final do subcapítulo 1.1 da dissertação. Mais concretamente, referem-se ao estudo comparativo do desempenho de reactores UASB com modo de funcionamento intermitente e contínuo no tratamento de efluentes de lacticínios durante o arranque, até uma Bv global de $12 \text{ g CQO}_T \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$. As lamas usadas inicialmente para inocular os reactores e as Bv's iniciais de arranque são diferentes das usadas em estudos anteriores (Nadais *et al.*, 2005; Nadais *et al.*, 2006), e esse efeito será avaliado por comparação com os resultados obtidos neste estudo. Também se pretende comparar os resultados obtidos à Bv global de $12 \text{ g CQO}_T \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ após o arranque e em estado estacionário a essa Bv durante cerca de 2 anos. O estado estacionário foi caracterizado durante cerca de um mês, antes do início do arranque dos reactores com lamas novas.

Outro dos objectivos do trabalho refere-se à interpretação dos resultados de caracterização biológica da biomassa (lamas) em estado estacionário, nos dois modos de funcionamento em estudo. A caracterização biológica, propriamente dita, será realizada ao nível da morfologia dos microrganismos, neste trabalho, e ao nível molecular pelos parceiros de projecto. Não foi, no entanto, possível obter estes resultados para o arranque, porque envolvem análises morosas e que não foram concluídas para interpretação nesta dissertação.

4

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTO

Neste estudo foram usados três reactores UASB de acrílico, designados de reactores A, B e C, com um volume reaccional de 6 L cada um. Este volume exclui a zona superior do reactor onde não ocorre a digestão anaeróbia devido à ausência das lamas propriamente ditas tal como foi considerado por Fang e Chui (1993). Os reactores são constituídos por uma camisa de aquecimento por onde se fez circular água a 35°C devido à acção de circuladores térmicos imersíveis (Haake C10 e Lauda E100); contêm ao longo da sua altura quatro canais de amostragem interior; e apresentam um separador de três fases (sólida-líquida-gasosa) modificado segundo Fergala e Sayed (1995). Este separador é constituído por uma placa conectada a um tubo com orifícios e permite a separação de fases bem como o refluxo de partículas de novo para a cama de lamas. A alimentação foi realizada a partir da base dos reactores com o auxílio de bombas peristálticas (Watson Marlow, tubo Watson Marlow Pumpsil 913.A Ø3,2mm) e no topo, uma saída lateral em sifão serviu para a colecta do efluente de saída, enquanto que uma saída superior serviu para o escape do biogás através de um tubo conectado a medidores de gás húmidos (Schlumberger). Um diagrama esquemático encontra-se exemplificado na Figura 6.

Cada ciclo de funcionamento dos reactores intermitentes (reactores A e B) caracterizou-se por uma fase de alimentação de 48 horas com uma Bv 2 vezes superior à do reactor contínuo (reactor C), seguida de uma fase de estabilização em que o efluente de saída foi re-introduzido no reactor durante mais 48 horas (recirculação do efluente de saída). Este modo de funcionamento equivaleu a uma Bv global, relativa a um ciclo de 96 horas, igual à Bv aplicada ao reactor com o modo de funcionamento contínuo e foi considerado o modo de funcionamento óptimo para os reactores intermitentes por Nadais *et al.* (2005). Durante a alimentação dos reactores, o caudal foi ajustado diariamente a 0,5 L.h⁻¹, enquanto que na fase de estabilização dos reactores intermitentes,

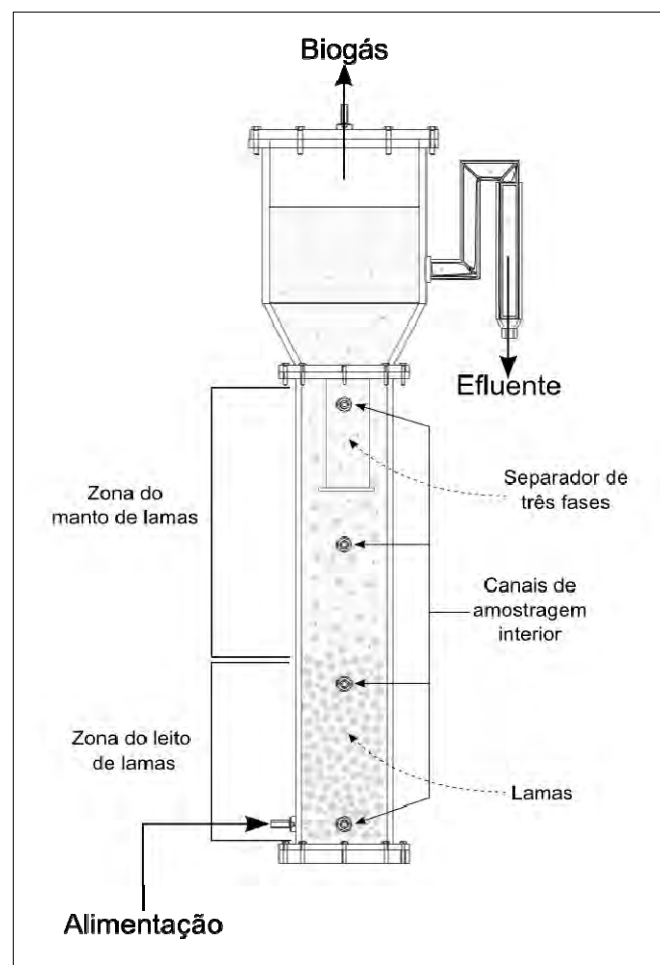


Figura 6. Diagrama esquemático do reactor.

intermitentes, o caudal de recirculação foi de $1,5 \text{ L.h}^{-1}$, tal como descrito por (Nadais *et al.*, 2006).

4.2 PLANO EXPERIMENTAL

Os reactores encontravam-se em funcionamento há cerca de 2 anos com uma Bv global de $12 \text{ g CQO}_T.\text{L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, relativa à CQO total (CQO_T). Esse tratamento foi mantido e caracterizado durante cerca de um mês, referente à operação dos reactores em estado estacionário (Fase 1). Posteriormente, os reactores foram lavados e re-inoculados com lamas anaeróbias de um digestor tratando efluentes da indústria de produção de queijos (Fromagerie Bell, Vale de Cambra) (Tabela 7).

Tabela 6. Caracterização físico-química do inoculo inicial

Parâmetro	Valor
SST (mg.L^{-1})	$21,33 \pm 2,15$
SSV (mg.L^{-1})	$14,60 \pm 1,45$
pH	$7,31 \pm 0,02$
CQO solúvel (mg.L^{-1})	30 ± 3

Em cada reactor introduziu-se 5L de lamas e perpez-se o volume com água da rede, de forma que a concentração final de SSV equivalou a $12,2 \text{ g SSV.L}^{-1}$, tendo-se depois iniciado o plano experimental de arranque dos reactores (Fase 2).

A alimentação consistiu num efluente sintético que se pretendeu simular os efluentes genéricos emitidos pelas indústrias de lacticínios e foi preparada *de-novo* cada 96 horas no caso dos reactores intermitentes e cada 48 horas no caso do reactor contínuo. Diluiu-se leite meio-gordo comercial (Auchan) em água da rede de maneira a ser obtida a CQO desejada. Devido a ligeiras flutuações da CQO entre os pacotes de leite usados ($\text{CQO}_{\text{médio}} \approx 130 \text{ gCQO}_T.\text{L}^{-1}$), este parâmetro foi determinado previamente a cada alimentação. Por cada L de alimentação adicionou-se 1 ml de cada solução de nutrientes (ver composição na Tabela 7) e 2 g de alcalinidade na forma de bicarbonato de sódio (NaHCO_3 , Riedel de-Häen) e bicarbonato de potássio (KHCO_3 , Riedel de-Häen) (1:1). A escolha da adição de KHCO_3 teve por base o alívio da toxicidade ao sódio presente no bicarbonato de sódio, geralmente fornecido como única forma de alcalinidade em digestores anaeróbios (Kyazze *et al.*, 2007). No caso do reactor contínuo, adicionou-se um total de 2 g de alcalinidade por L de alimentação, enquanto que nos reactores intermitentes forneceu-se o dobro da alcalinidade, de forma a que, no global, a alcalinidade fornecida fosse igual nos dois tipos de operação investigados.

Tabela 7. Composição das soluções de nutrientes (segundo Nadais (2002)).

Solução	Marca	Concentração (mg.L^{-1})
<i>Macronutrientes I</i>		
NH_4Cl	Riedel de-Häen	170
KH_2PO_4	Merck	37
<i>Macronutrientes II</i>		
$\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$	Riedel de-Häen	8
$\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$	Riedel de-Häen	9
<i>Micronutrientes</i>		
$\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$	Panreac	2454
$\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$	Merck	2000
$\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$	Riedel de-Häen	500
$\text{CuCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	30
ZnCl_2	Sigma-Aldrich	50
H_3BO_3	Panreac	50
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}.4\text{H}_2\text{O}$	Riedel de-Häen	90
EDTA	Riedel de-Häen	1000
$\text{NiCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$	Riedel de-Häen	50

4. MATERIAL E MÉTODOS

O plano experimental de arranque dos reactores consistiu no aumento progressivo da Bv em cargas identificadas em numeração romana de acordo com o referido nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Plano experimental de arranque para os reactores intermitentes (A e B).

Carga	C_{in} (gCQO _T .L ⁻¹)	B _v durante a alimentação (gCQO _T .L ⁻¹ .dia ⁻¹)	B _v global (gCQO _T .L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Nº de ciclos	Tempo (dias)
I	1	2	1	3	12
II	2	4	2	7	28
III	3	6	3	3	12
IV	4,5	9	4,5	8	32
V	6	12	6	7	28
VI	8	16	8	10	40
VII	12	24	12	11	44

Tabela 9. Plano experimental de arranque para o reactor contínuo (C).

Carga	C_{in} (gCQO _T .L ⁻¹)	B _v durante a alimentação (gCQO _T .L ⁻¹ .dia ⁻¹)	B _v global (gCQO _T .L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Nº de ciclos	Tempo (dias)
I	0,5	1	1	3	12
II	1	2	2	7	28
III	1,5	3	3	3	12
IV	2,25	4,5	4,5	8	32
V	3	6	6	7	28
VI	4	8	8	10	40
VII	6	12	12	11	44

Os incrementos na Bv foram realizados com base no aumento da CQO da alimentação a caudal constante. Corresponderam a incrementos entre os 25 e os 33% excepto na Bv II, que correspondeu a uma aumento de 50%. O momento em que foi realizada a mudança de carga foi decidida com base na estabilidade da produção de metano.

4.3 ACTIVIDADE METANOGÉNICA ESPECÍFICA

As lamas inicialmente usadas para o arranque dos reactores UASB (fase 2) foram caracterizadas em termos da sua actividade metanogénica específica (AME) de acordo com Nadais *et al.* (2001). Para a realização deste ensaio, usou-se balões de 250 ml de fundo redondo em banho termostatzado a 35°C e como substratos usou-se ácido acético ($C_2H_4O_2$, Riedel-de Häen), glucose ($C_6H_{12}O_6$, V. Reis, Lda.), leite magro e leite meio-gordo (Auchan). Foi feita uma montagem experimental que permite a quantificação do volume de biogás produzido por um sistema de deslocação de água, bem como a determinação da % de metano no biogás, como se exemplifica na Figura 7.

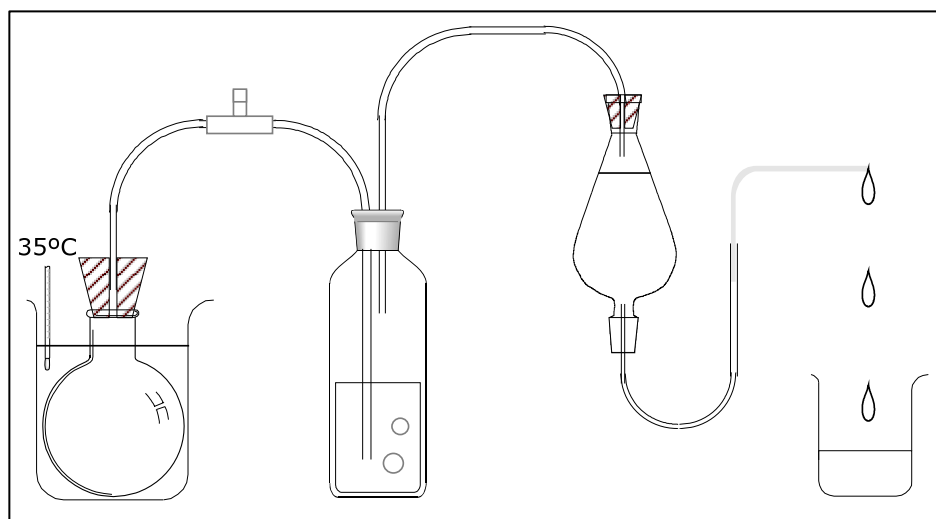
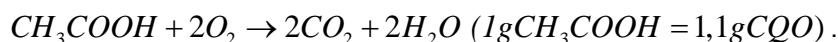
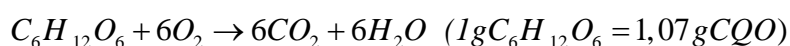


Figura 7. Diagrama esquemático da montagem usada na determinação da actividade metanogénica específica.

Determinou-se os SST e SSV das lammas como está descrito no ponto 4.4.5. deste capítulo. Também se determinou a CQO de todos os substratos como está descrito no ponto 4.4.1. deste capítulo. No caso da glucose e do acetato, poder-se-ia ter calculado apenas a CQO que teoricamente está associada a estes substratos como se exemplifica nas equações,



No entanto, optou-se por não se determinar a CQO que teoricamente está associada à oxidação da glucose ou do acetato, devido a desvios que ocorrem entre a sua CQO teórica e a CQO prática, e determinou-se a CQO destes substratos laboratorialmente. Posteriormente calculou-se as quantidades de lamas, substratos, alcalinidade, macro e micronutrientes a adicionar aos balões, considerando um volume reaccional de 200 ml, tal como se exemplifica na Tabela 10. Foi realizado um branco de ensaio ao qual não foi adicionado qualquer substrato, a fim de ser determinada a produção de metano de fundo das amostras.

A determinação da AME com ácido acético foi testada de três formas: sem neutralização; com neutralização usando NaOH 3M (Panerac) até pH 7; e com neutralização usando NaHCO₃ até pH 7. Nos dois últimos casos não se observou produção de metano, ou se houve, foi muito pouca relativamente ao primeiro caso, e por isso, os dados de AME apresentados no capítulo 5 com o ácido acético como substrato não envolvem qualquer tipo de neutralização prévia.

A adição dos substratos foi realizada no final da adição de todos os outros componentes do ensaio. Imediatamente após a adição dos substratos, fez-se borbulhar N₂ nos balões durante cerca de 2 minutos, introduziu-se os balões na montagem de determinação da AME, previamente isolada de qualquer tipo de fugas gasosas que poderiam ocorrer ao nível das conexões, e iniciou-

Tabela 10. Quantidades dos componentes usados na determinação da actividade metanogénica específica.

Parâmetro	C inicial	C final	Quantidade adicionada
Lamas	14,59 g SSV.L ⁻¹	5 g SSV.L ⁻¹	68,5 ml
Substratos	Ácido acético	1,58 Kg CQO.L ⁻¹	6 g CQO.L ⁻¹
	Glucose	0,917 g CQO.g ⁻¹	6 g CQO.L ⁻¹
	Leite magro	95,3 g CQO.L ⁻¹	6 g CQO.L ⁻¹
	Leite meio gordo	132,83 g CQO.L ⁻¹	6 g CQO.L ⁻¹
Alcalinidade	-	5 g NaHCO ₃ .L ⁻¹	1 g
Macronutrientes I	-	1 ml.L ⁻¹	0,2 ml
Macronutrientes II	-	1 ml.L ⁻¹	0,2 ml
Micronutrientes	-	1 ml.L ⁻¹	0,2 ml

-se o ensaio. Durante o ensaio, determinou-se o volume de biogás e % de metano no biogás de 2 em 2 horas sempre que possível e agitou-se os balões manualmente cerca de 1-2 vezes por dia até não ser observada produção de biogás. Posteriormente, calculou-se a AME por aplicação da seguinte fórmula,

$$AME(mlCH_4.h^{-1}.gSSV^{-1}) = \frac{\Delta V_{CH_4}(ml)}{\Delta t(h) \times SSV(g.L^{-1}) \times V_{reaccional}(L)}$$

tendo em consideração apenas os valores referentes ao declive inicial curva de evolução da produção de metano (xx) ao longo do tempo (yy). As curvas foram obtidas com o programa Curve Expert (versão 1.4). A produção de metano de fundo das amostras foi nula, e por isso não foi subtraída ao valor obtido com a adição de substratos.

4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Para a realização das análises físico-químicas dos efluentes, recolheu-se 100 ml de amostra do recipiente de colecta do efluente de saída e 50 ml do recipiente de alimentação cada 48 em 48 horas. As amostras de efluente de saída foram caracterizadas imediatamente em termos de pH, CQO_T, CQO_S e alcalinidade, tendo-se preservado amostras para a caracterização posterior em AOV's. As amostras de alimentação foram caracterizadas imediatamente apenas em termos da CQO_T para efeitos do cálculo da Bv efectiva, uma vez que, ao fim de 48 horas ocorre alguma degradação da CQO do recipiente de alimentação à temperatura ambiente, altura em que foi preparada a alimentação *de-novo* no caso do reactor contínuo. O caudal de entrada foi considerado igual ao caudal de saída, assumindo a aplicação do princípio de conservação de massa no sistema. Apesar do ajuste diário do caudal de entrada na percentagem de rotação

imposta pelas bombas peristálticas de alimentação, registou-se o volume de efluente de saída no balde de colecta ao fim de cada 48 horas para efeitos do cálculo da Bv efectiva.

A determinação da composição do biogás foi realizada diariamente, bem como a medição do volume de biogás produzido. A determinação dos SST e SSV foi realizada na caracterização do inoculo inicial usado no arranque dos reactores (Fase 2) e na determinação da AME destas lamas.

4.4.1 CARÊNCIA QUÍMICA EM OXIGÉNIO (CQO)

A matéria orgânica libertada em águas receptoras pode reduzir ou eliminar o seu oxigénio dissolvido. Como tal, a medição da matéria orgânica em águas pode ser realizada através da determinação da sua carência em oxigénio. Por definição, a carência química em oxigénio (CQO) é, uma medida da matéria orgânica que pode ser oxidada por um reagente químico oxidante forte (Himebaugh e Smith, 1979). Indirectamente, é também uma medida da quantidade de electrões nos substratos disponíveis para oxidação (Fang e Yu, 2001).

A determinação do CQO neste estudo foi realizada segundo o método colorimétrico de refluxo fechado (APHA, 1998). Sucintamente, o método baseia-se numa oxidação de duas horas na presença de dicromato de potássio em excesso e ácido sulfúrico quente.

Preparou-se os seguintes reagentes: solução de dicromato gama alta – secou-se cerca de 25g de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$, Riedel de-Häen) na estufa (WTC Binder E28) a 110°C até peso constante, pesou-se exactamente 20,432g de dicromato de potássio seco e 66,6g de sulfato de mercúrio ($HgSO_4$, Riedel de-Häen) os quais foram dissolvidos em 500 ml de água destilada e 167 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 , Riedel de-Häen), após arrefecimento sob agitação adicionou-se o mesmo volume de água destilada e ácido sulfúrico concentrado e deixou-se sob agitação durante 24 horas, ao fim desse tempo perfez-se o volume para 2L com água destilada; solução de dicromato gama baixa – foi preparada da mesma forma que a solução de dicromato gama alta com apenas 3,4053g de dicromato de potássio; solução de ácido sulfúrico e sulfato de prata – dissolveu-se 25g de sulfato de prata (Ag_2SO_4 , Panreac) em 2,5L de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 , Riedel de-Häen) durante 24 horas.

Em cada tubo de digestão (vidro, rolhas revestidas a TFE, lavados em ácido nítrico comercial a 20%) dispensou-se 2,5 ml da solução de ácido sulfúrico e sulfato de prata, 1,5 ml da solução de dicromato e 2,5 ml de amostra. A digestão foi realizada a 150°C durante 2 horas numa câmara de digestão específica (Aqualytic AL38), ao fim da qual os tubos foram deixados arrefecer no escuro à temperatura ambiente. Determinou-se a absorvância a 600 nm para as amostras com solução de dicromato na gama alta e a 420 nm para a gama baixa num espectrofotómetro específico (Aqualytic PC Compact COD Vario).

A calibração do espectrofotómetro foi realizada sempre que novos reagentes foram preparados através do recurso a soluções-padrão de hidrogenoftalato de potássio (HFK) ($C_8H_5KO_4$, Riedel de-Häen) a 900mg CQO.L^{-1} para a gama alta e a 90 mgCQO.L^{-1} para a gama baixa, de acordo com as especificações do equipamento. Para a preparação da solução-padrão secou-se cerca de 1g de HFK a 110°C até peso constante, dissolvendo-se exactamente 765mg de HFK (gama alta) e de 85mg de HFK (gama baixa) num litro de água destilada. Os padrões foram posteriormente tratados como as amostras. Por cada amostragem foi realizado um branco de análise.

4.4.2 pH

O pH foi determinado em 50 ml de amostra agitada mecanicamente. Usou-se um eléctrodo de pH (Consort C535) calibrado semanalmente com soluções-tampão de pH 4 e 7 (Panreac).

4.4.3 ALCALINIDADE

A alcalinidade é considerada em sistemas neutros a alcalinos (pH 6-10) como uma medida da concentração de bicarbonato no sistema. Por este motivo, a sua determinação baseia-se numa titulação simples com uma solução ácida até ao ponto final pH 4,5 (Neal, 2001).

Neste estudo determinou-se a alcalinidade pelo método potenciométrico (APHA, 1998). Introduziu-se ácido clorídrico 1N (HCl, Riedel de-Häen) numa bureta de 50 ml, e titulou-se 50 ml de amostra agitada mecanicamente até pH 4,5 usando um eléctrodo de pH (Consort C535). Por fim, utilizou-se a seguinte fórmula para calcular a alcalinidade da amostra como $\text{mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$:

$$\text{Alcalinidade}(\text{mgCaCO}_3.\text{L}^{-1}) = \frac{V_{\text{HCl}}(\text{ml}) \times C_{\text{HCl}}(\text{mol.L}^{-1}) \times M_{\text{CaCO}_3}(\text{g.mol}^{-1})}{V_{\text{amostra}}(\text{ml}) \times 10^{-3}}$$

4.4.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (AOV'S)

O teor de AOV's foi determinado por cromatografia gás-líquido usando o cromatógrafo de gás Chrompack modelo 9001 equipado com um detector de ionização de chama (*Flame Ionization Detector*, FID). Foi usada uma coluna CP-sil5-CB com as seguintes dimensões: 25m x 0,53 mm x 5 μm . O hélio foi o gás de arraste com um caudal de 8 ml/min. A temperatura máxima da coluna foi de 290°C , a de injeção 270°C , e a do detector 300°C . O programa de aquisição de dados foi o Jasco Borwin, versão 1.5.

A determinação dos AOV's presentes no efluente de saída dos reactores em estudo foi realizada após filtração por vácuo (filtros Reeve Angels 403). Pipetou-se 5 ml de filtrado para tubos de plástico escuros devidamente identificados e adicionou-se como preservante 1,5 ml de ácido fórmico (HCOOH, Panreac), tendo-se depois refrigerado as amostras a -4°C até análise. As análises foram realizadas até uma semana depois, e consistiu na injeção de 5 µl de amostra no cromatógrafo, com uma seringa específica, tempo de corrida 12,7 minutos, e posterior análise dos cromatogramas obtidos.

Para a calibração foram usados os seguintes ácidos orgânicos voláteis com grau de pureza $\geq 99,8\%$: acético (C₂H₄O₂, Riedel de Hæn), propiónico (C₃H₆O₂, Merck), iso-butírico (C₄H₈O₂, Sigma-Aldrich), n-butírico (C₄H₈O₂, Merck), iso-valérico (C₅H₁₀O₂, Sigma-Aldrich), n-valérico (C₅H₁₀O₂, Sigma-Aldrich) e n-capróico (C₆H₁₀O₂, Sigma-Aldrich). As soluções-padrão usadas na calibração foram preparados a partir de uma solução-stock secundária de 2500 mg.L⁻¹ que foi, por sua vez, preparada a partir de uma solução stock primária de 10000 mg.L⁻¹. As concentrações usadas na calibração foram de 0, 50, 100, 250, 500 e 1000 mg.L⁻¹.

Cada solução-padrão foi injectada em duplicado e a média do valor da área dos picos obtidos foi usada para a construção da recta de calibração. O branco, água bi-distilada, foi subtraído a cada concentração uma vez que as rectas de calibração foram expressas na forma de $y = mx$. A análise dos tempos de retenção para cada ácido orgânico foi realizada através do cálculo dos tempos de retenção máximos e mínimos obtidos para cerca de 15 soluções-padrão injectadas. A determinação dos limites de detecção foi obtida, após a injeção de 30 brancos, através da aplicação da seguinte fórmula,

$$LD(\text{limite de detecção}) = \frac{3\sigma_{\text{branco}}}{m'}$$

com m' =declive da recta de calibração de cada ácido e σ =desvio-padrão (Skoog *et al.*, 1998). O resultado da calibração encontra-se exemplificado na Tabela 11.

Tabela 11. Calibração do método de análise de AOV's.

AOV	Fórmula química	Massa molar (g.mol ⁻¹)	LD (mg.L ⁻¹)	Tempo de retenção (min)		Recta de calibração	
				Máximo	Mínimo	Equação	r ²
Acético	C ₂ H ₄ O ₂	60	28,86	2,017	1,983	A=1612,9xC	0,998
Propiónico	C ₃ H ₆ O ₂	74	25,74	2,725	2,658	A=2757,8xC	0,998
Isobutírico	C ₄ H ₈ O ₂	88	34,14	3,300	3,225	A=3339,4xC	0,998
n-butírico	C ₄ H ₈ O ₂	88	8,28	3,683	3,608	A=3376,9xC	0,998
isovalérico	C ₅ H ₁₀ O ₂	102	15,33	4,592	4,458	A=3878,9xC	0,998
n-valérico	C ₅ H ₁₀ O ₂	102	4,70	5,275	5,142	A=3674,2xC	0,998
n-capróico	C ₆ H ₁₀ O ₂	114	13,30	6,925	6,833	A=3722,4xC	0,998

LD-limite de detecção;

A-Área (µV.s);

C-Concentração (mg ácido.L⁻¹).

Apesar dos cuidados na preparação de um branco em cada análise e na injeção de um branco em cada 10 amostras; na utilização de água bi-destilada na preparação dos brancos (a água mais pura disponível no laboratório); e por último, nas lavagens da seringa de injeção 20x em acetona e 20x em água bi-destilada consecutivamente antes e depois da injeção das amostras, os valores de LD são elevados e por isso não foi calculado o valor do limite de quantificação que faria elevar o valor limite para consideração dos AOV's presentes nas amostras. Este fenómeno deve-se possivelmente à idade da coluna.

A apresentação dos resultados dos AOV's foi realizada após conversão das concentrações obtidas de cada ácido em mg de ácido acético por litro (mg Ac.L^{-1}) através da seguinte fórmula,

$$C_{\text{ácido}}(\text{mgAc.L}^{-1}) = \frac{C_{\text{ácido}}(\text{mg}_{\text{ácido}}.\text{L}^{-1}) \times M_{\text{ácido acético}}(\text{g.mol}^{-1})}{M_{\text{ácido}}(\text{g.mol}^{-1})}.$$

Valores abaixo do LD foram considerados não detectados (nd). Na construção gráfica dos resultados obtidos, uma vez que valores abaixo do LD não correspondem a valores mensuráveis, foram considerados nulos tal como por Buzzini e Pires (2007).

A substanciar a validade do método tem-se que o LD está bastante abaixo dos limites de AOV's para a realização de uma digestão anaeróbia equilibrada (entre 200-500 mg Ac.L^{-1}) (Henze, 1997).

4.4.5 SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS (SST) E VOLÁTEIS (SSV)

Os SST e SSV foram determinados segundo APHA (1998). Calcinou-se filtros (filtros Reeve Angels 403) na mufla a 550°C durante 15 minutos em cadinhos de porcelana devidamente identificados, deixou-se arrefecer em escicador e determinou-se a tara ($m_{\text{cadinho+filtro}}$) (balança Precisa XB 120A: Max. 120g; min. 0,01g, d=0,0001g; e=0,001g). Posteriormente, filtrou-se 10 ml de amostra por vácuo (filtros Reeve Angels 403) e colocou-se os filtros na estufa a 110°C até peso constante, tendo-se registado este peso após pelo menos 2 horas de arrefecimento em escicador ($m_{\text{cadinho+filtro+amostra seca}}$). Para a determinação dos sólidos suspensos voláteis foi necessário calcinar os filtros na mufla a 550°C até peso constante. O peso final foi registado após arrefecimento a temperatura ambiente no escicador ($m_{\text{cadinho+filtro+amostra calcinada}}$).

Usou-se as seguintes fórmulas no cálculo dos sólidos suspensos totais e voláteis:

$$SST(\text{mg.L}^{-1}) = \frac{m_{\text{cadinho+filtro+amostra seca}}(\text{mg}) - m_{\text{cadinho+filtro}}(\text{mg})}{V_{\text{amostra}}(\text{L})}$$

$$SSV(mg.L^{-1}) = \frac{m_{\text{cadinho+filtro+amostra calcinada}}(mg) - m_{\text{cadinho+filtro+amostra seca}}(mg)}{V_{\text{amostra}}(L)}$$

4.4.6 COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS

A determinação da composição do biogás, isto é, a % de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂), foi realizada por cromatografia gasosa usando o cromatógrafo de gás SRI8610C equipado com um detector de condutividade térmica (*Thermal Conductivity Detector*, TCD). Foi usada uma coluna Stainless Steel Packed Column, Haysep Q, com as seguintes dimensões: 2,5m x 2,1mm I.D.. O hélio foi o gás de arraste com um caudal de 10 ml/min. A temperatura do forno foi de 60-61°C e do detector de 153°C. O programa de aquisição de dados foi o Peak Simple, versão 3.29.

4.5 ANÁLISES BIOLÓGICAS

No final da Fase 1 do plano experimental, recolheu-se amostras de biomassa do interior dos reactores para a análise morfológica dos microrganismos presentes bem como para a análise molecular da comunidade microbiana em termos dos principais grupos de microrganismos e dos géneros presentes.

4.5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Preparou-se as amostras de biomassa para observação ao microscópio pelo método de fixação clássico à chama (Murray *et al.*, 1994). Todo o material usado foi previamente esterilizado numa solução de éter etílico:etanol (1:1) ((C₂H₅)₂O, Fisher Scientific; C₂H₆O, Riedel de-Häen) (Calado, 2009). Realizou-se um esfregaço da biomassa recolhida com o auxílio de uma ança sobre uma lâmina, de forma a que a biomassa fosse espalhada suave e homogeneamente. Foi também recolhido sobrenadante e preparado de igual forma. Fixou-se as amostras durante cerca de 2 minutos à chama e depois corou-se para aumentar o contraste durante a observação microscópica. Aplicou-se cerca de 3 gotas de uma solução de safranina O 0,2% (C₂H₁₉CIN₄, Acrós Organics) durante 3-4 minutos, removeu-se o corante com água destilada e secou-se as amostras com papel absorvente.

A coloração Gram é a mais importante técnica diferencial aplicada às bactérias. Em teoria é possível agrupar as bactérias em 2 grandes grupos, as Gram-positivas e as Gram-negativas, mas na prática poderão existir bactérias Gram-variáveis. A técnica baseia-se na interacção entre o violeta de cristal e o iodo na integridade e estrutura da parede celular, particularmente na arquitectura da camada de peptidoglicanos das Eubacteria. A parede celular das bactérias Gram-

positivas não permite a extração do complexo violeta de cristal-iodo que se forma no citoplasma, com o uso de um solvente, enquanto que a parede celular das bactérias Gram-negativas permite-o. Assim, as bactérias Gram-positivas apresentam uma cor azul-rôxa, enquanto que as Gram-negativas apresentam uma cor avermelhada devido à contra-coloração com safranina (Murray *et al.*, 1994).

Usou-se o método de Hucker na realização da coloração Gram de acordo com Murray *et al.* (1994), com ligeiras alterações devido aos reagentes disponíveis no laboratório. Preparou-se a seguinte solução: solução de violeta de cristal – adicionou-se 0,8g de oxalato de amónio ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2\text{O}$, Merck) a 100 ml a uma solução de violeta de cristal 2% em etanol ($\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClN}_3$, Panreac) e filtrou-se antes do uso. Aplicou-se, a cada amostra fixa à chama, cerca de 3 gotas de solução de violeta de cristal durante 1 minuto e removeu-se o corante com água destilada durante 2 segundos; de seguida, aplicou-se cerca de 3 gotas de licor de lugol 0,4% (Panreac), removeu-se o corante com água destilada durante 2 segundos e secou-se a amostra com papel absorvente; depois inundou-se a amostra com etanol 96% ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, Riedel-de Hæn) durante 3 segundos e com agitação, e removeu-se o excesso de etanol; finalmente realizou-se a contra-coloração com uma solução de safranina 0.0,2% ($\text{C}_2\text{H}_{19}\text{ClN}_4$, Acrós Organics) durante 10 segundos, removeu-se o corante com água destilada até deixar de aparecer corante na corrente de água e secou-se a amostra com papel absorvente.

Observou-se as amostras preparadas ao microscópio óptico (Zeiss Axioplan2 Imaging) com uma ampliação de 1000x usando óleo de imersão e adquiriu-se as imagens obtidas com uma máquina fotográfica Olympus DP70.

4.5.2 ANÁLISE MOLECULAR

Caracterizou-se a comunidade microbiana por métodos moleculares baseados na clonagem e sequenciação dos genes que codificam para o ARN da sub-unidade 16S usando sequências oligonucleotídicas especificamente desenhadas para o efeito. As sequências obtidas foram analisadas por recurso a ferramentas bioinformáticas e comparadas com sequências depositadas em bases de dados como o *GenBank*. Esta análise foi realizada no Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia no Instituto Superior Técnico pela equipa do Prof. Jorge Leitão.

4.6 CÁLCULOS

A CQO do recipiente de alimentação foi determinada cada 48 horas, ou seja, no início e no final de cada alimentação. Como tal, a CQO da alimentação, expressa com base na CQO_T é uma média da CQO obtida nesses tempos:

$$CQO_{T,alimentação} (g.L^{-1}) = \frac{(CQO_{T,0h} + CQO_{T,48h})}{2}.$$

A carga orgânica volúmica (Bv) efectiva pôde, assim, ser calculada a partir desse valor através da seguinte fórmula:

$$Bv(gCQO.L^{-1}dia^{-1}) = CQO_{T,alimentação} (g.L^{-1}) \times Q(L.dia^{-1}) \times \left(\frac{1}{V_{reactor}} \right) (L^{-1})$$

No caso da eficiência de remoção (E_R) da CQO utilizou-se a seguinte fórmula:

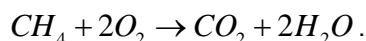
$$E_R (\%) = \frac{CQO_{T,alimentação} - (CQO_{s,xh})_{efluente}}{CQO_{T,alimentação}} \times 100$$

com $x=48$ horas no caso do reactor contínuo ou 96 horas no caso dos reactores intermitentes.

Para o cálculo da eficiência de metanização (E_M) foi primeiro necessário converter o volume de CH_4 produzido a número de moles por aplicação da lei dos gases perfeitos ($PV=nRT$),

$$n_{CH_4} (Kmol) = \frac{V_{CH_4} (m^3) \times 101325 (Pa)}{8314 \left(\frac{J}{Kmol} \right) \times (35 + 273) (K)}.$$

Depois, a CQO do metano ($CQO-CH_4$) foi determinada com base na seguinte estequiometria,



E com base na seguinte fórmula,

$$CQO-CH_4 (g) = \frac{n_{CH_4} (Kmol)}{1000} (mol) \times 2 \times 32 \left(\frac{g}{mol} \right).$$

Para finalizar, calculou-se a E_M com base na CQO removida através da seguinte fórmula,

$$E_M (\%) = \frac{CQO-CH_4(g)}{\left(CQO_{T,alimentação} \times \frac{E_R}{100} \times V_{alimentação} \right) (g)} \times 100 .$$

A produtividade em metano (P_{CH_4}) foi calculada, através da seguinte fórmula,

$$P_{CH_4} (LCH_4 \cdot CQO_r^{-1}) = \frac{V_{CH_4} (L)}{\left(CQO_{T,alimentação} \times \frac{E_R}{100} \times V_{alimentação} \right) (g)}$$

Nos reactores intermitentes, as eficiências de remoção e metanização foram calculadas para os valores referentes à fase de alimentação (alim) (dois primeiros dias do ciclo de operação) e para os valores referentes ao global dos ciclos (quatro dias de operação). A diferença entre ambos, refere-se à contribuição da fase de estabilização (estab) para a eficiência de remoção e metanização globais. Esta pode, assim, ser calculada através da seguinte fórmula,

$$E_{R_{estab}} = E_{R_{global}} - E_{R_{alim}}$$

$$E_{M_{estab}} = E_{M_{global}} - E_{M_{alim}} .$$

Ainda é possível calcular a contribuição da CQO que foi removida na fase de alimentação e que foi convertida a metano, posteriormente, na fase de estabilização (E_M'), através da seguinte fórmula,

$$E_M' (\%) = E_{M_{estab}} - E_{R_{estab}}$$

5

RESULTADOS

5.1 OPERAÇÃO DOS REACTORES UASB DURANTE O ARRANQUE

Os resultados referentes à operação dos reactores durante o arranque (Fase 2 do estudo) foram sub-divididos consoante os parâmetros de operação determinados. A apresentação destes resultados foi realizada na forma gráfica, e na forma de Tabelas-resumo que se apresenta no final deste sub-capítulo, e que será referida ao longo da apresentação de resultados. Optou-se por comparar os resultados obtidos durante as fases 1 e 2 do estudo, no sub-capítulo seguinte (5.2), uma vez que a base de comparação é a última carga aplicada aos reactores na fase 2 do estudo.

5.1.1 AME DAS LAMAS INICIAIS

Na determinação da actividade metanogénica específica das lamas usadas no arranque dos reactores UASB, calculou-se o declive inicial da curva de produção de metano (yy) ao longo do tempo (xx) (Figura 8).

Através da análise da Figura 8, verifica-se que a duração da fase *lag* referente à produção de metano foi diferente para os diferentes substratos usados na determinação da AME. Para a glucose, a produção de metano ocorreu logo nas 2 primeiras horas de ensaio, e por isso não se considera que tenha ocorrido uma fase *lag*. Para o leite magro e meio-gordo, a fase *lag* teve a duração de cerca de 2 horas apenas, e para o ácido acético não foi possível determinar com rigor o início da produção de metano, uma vez que provavelmente ocorreu durante a noite, sendo apenas possível assumir que possa ter ocorrido, provavelmente, ao fim de 10 horas de ensaio por observação da curva com melhor *fit* no programa Curve Expert.

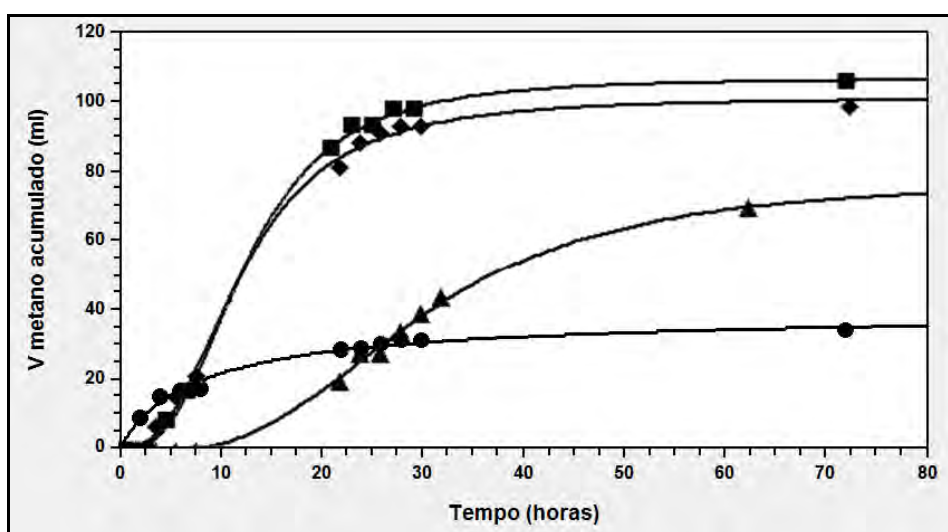


Figura 8. Evolução da produção de metano ao longo do tempo para a determinação da actividade metanogénica específica (Legenda: —●— com glucose; —■— com leite magro; —◆— com leite meio-gordo; —▲— com ácido acético).

Para o cálculo do declive inicial da curva de produção de metano (xx) ao longo do tempo (yy), a selecção dos pontos teve em conta que se referissem ao maior declive observado inicialmente. Para a glucose os pontos seleccionados referiam-se à produção de metano entre $x=0h$ e $x=2h$, para o leite magro entre $x=6h$ e $x=8h$, para o leite meio-gordo entre $x=4h$ e $x=6h$ e para o ácido acético entre $x=22h$ e $x=24h$. A determinação da AME para o acetato não pode ser considerada fiável, uma vez que não foi possível determinar com rigor a produção de metano inicial. Dos valores obtidos, verifica-se que a AME variou sensivelmente da seguinte forma consoante os substratos usados: glucose>leite magro, leite meio-gordo>ácido acético (Tabela 13).

Da figura 8, observa-se que, no final do ensaio, a produção acumulada de metano para os diferentes substratos não variou da mesma forma que a AME. Por isso, optou-se por se determinar também a eficiência de metanização, com base na CQO fornecida, para comparação. Dos valores obtidos, verifica-se que variou sensivelmente da seguinte forma: leite magro, leite meio-gordo>ácido acético>glucose (Tabela 12).

Tabela 12. Fase lag, AME e eficiência de metanização da CQO fornecida com os diferentes substratos usados na determinação da AME das lamas iniciais.

Parâmetro	Unidades	Glucose	Leite magro	Leite meio-gordo	Ácido acético
Fase lag	h	0	2	2	10*
AME	ml CH ₄ .h ⁻¹ .gSSV ⁻¹	4,45	4,31	4,35	3,86
Eficiência de metanização	%	8,6	26,9	24,9	17,6

* valor assumido a partir da curva obtida no programa *Curve Expert*

Apesar da eficiência de metanização referente ao ácido acético se ter baseado num valor obtido algumas horas antes do final do ensaio dos outros substratos, assumiu-se que a produção de metano tendeu a estabilizar, e portanto, que não variou de forma significativa

posteriormente. A determinação do volume de metano produzido com ácido acético ao final de 110 horas do ensaio confirma-o (dados não mostrados).

5.1.2 PRODUÇÃO DE METANO

A evolução da produção de metano por cada ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada e dos ciclos operados a cada carga apresenta-se na Figura 9.

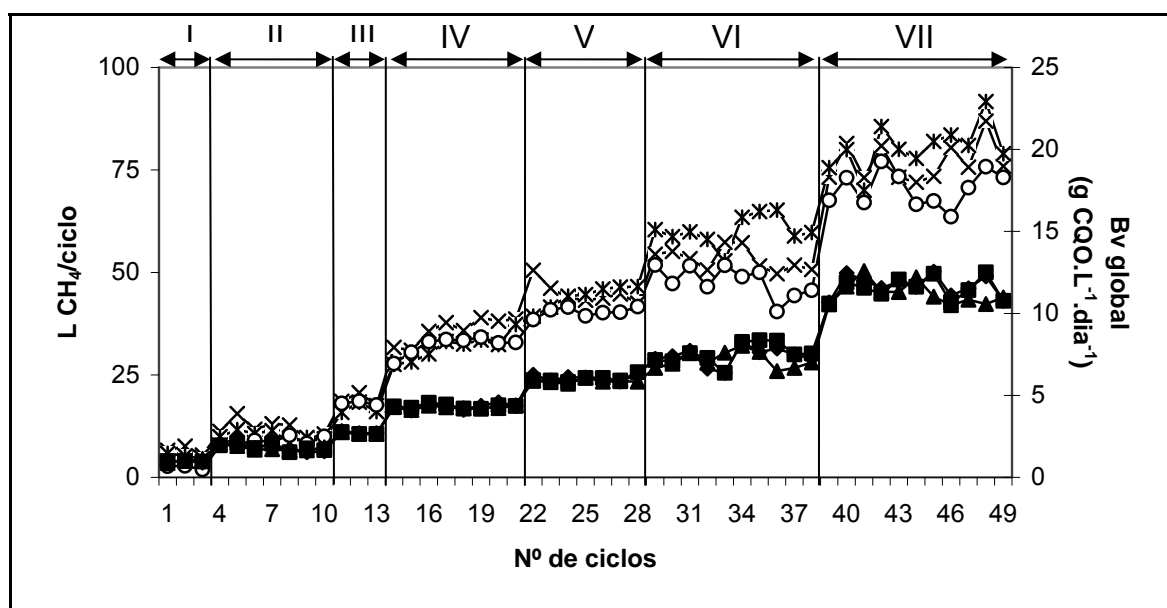


Figura 9. Evolução da produção de metano por ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada (Legenda: —x— reactor A; —*— reactor B; —o— reactor C; —◆— Bv aplicada ao reactor A; —■— Bv aplicada ao reactor B; —▲— Bv aplicada ao reactor C).

A produção de metano aumentou, de uma forma geral, com o aumento da Bv, em todos os reactores estudados. Esse aumento foi correlacionado linearmente e as rectas de correlação apresentam-se na Figura 10.

A partir da análise da Figura 9 e dos declives das rectas apresentadas na Figura 10, observou-se que, de uma forma geral, os reactores intermitentes produziram mais metano que o reactor contínuo, ao longo das cargas investigadas. Pelo declive das rectas, o reactor B foi o reactor que mais metano produziu. No entanto, nas cargas I à V, o reactor A obteve, em média, a produção de metano mais elevada (entre 7 a 45 $\text{LCH}_4\cdot\text{ciclo}^{-1}$), comparativamente com o reactor B (entre 5 a 44 $\text{LCH}_4\cdot\text{ciclo}^{-1}$) e C (entre 2 a 40 $\text{LCH}_4\cdot\text{ciclo}^{-1}$). Nas cargas seguintes, da VI à VII, o reactor A produziu, em média, cerca de 53 e 77 $\text{LCH}_4\cdot\text{ciclo}^{-1}$, respectivamente (ver Tabelas 13, 14 e 15). Comparativamente com o reactor C, o reactor A produziu entre 4 a 62% mais metano que o reactor C, e estes valores mínimo e máximo verificaram-se nas cargas III e I, respectivamente. Nas cargas IV, V e VI, o reactor A produziu, em média, cerca de 10% mais metano que o reactor

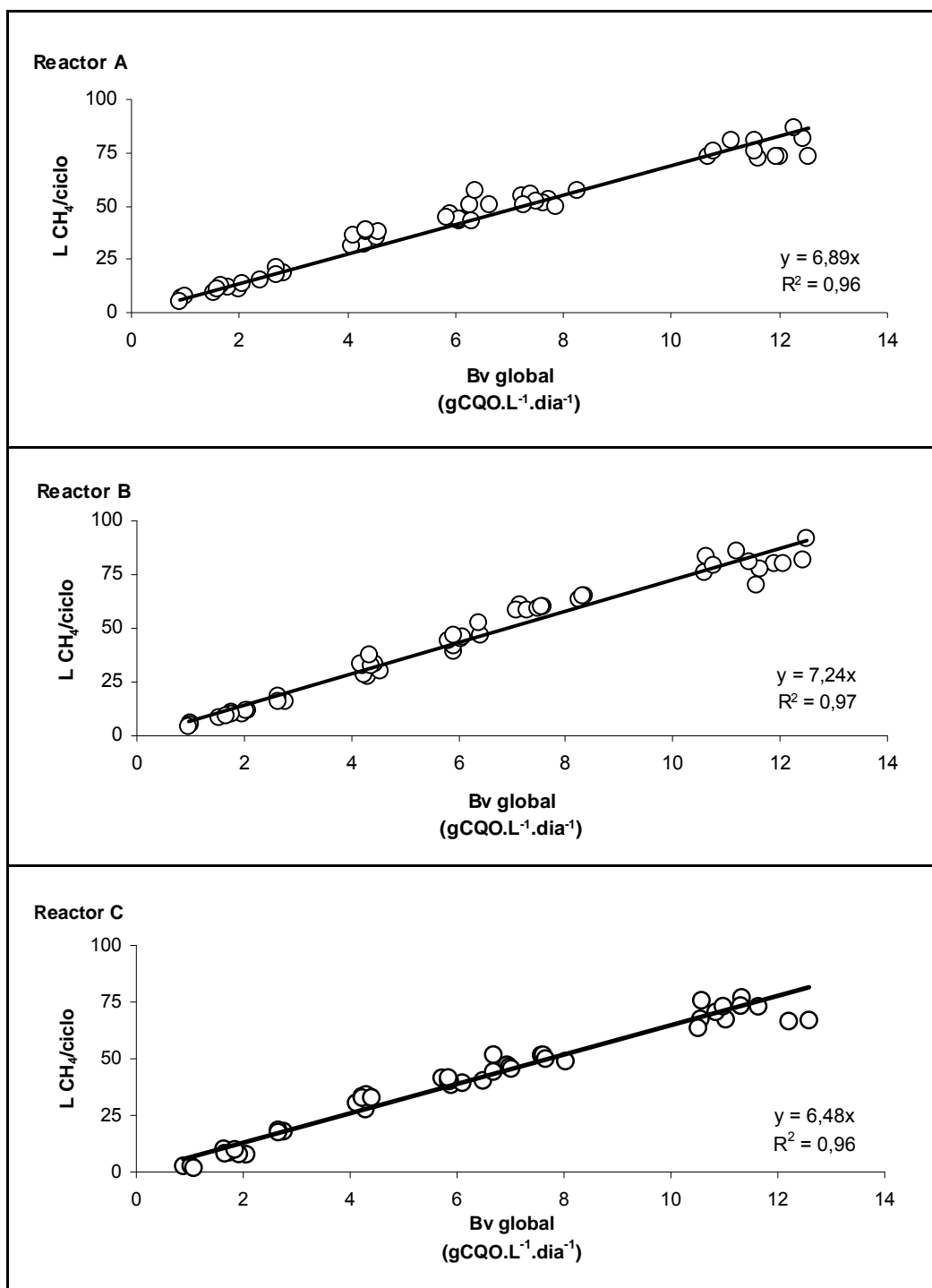


Figura 10. Correlação linear entre a produção de metano por ciclo de operação e a Bv aplicada para os reactores intermitentes (A e B) e contínuo (C).

C, com uma descida para 8% na última carga aplicada.

Ao contrário do reactor A, e, apesar de, inicialmente o reactor B produzir mais metano que o reactor C, nas cargas III e IV este reactor intermitente produziu, em média, menos ou a mesma quantidade de metano que o reactor contínuo, com valores entre 17 e 32 $L\ CH_4.ciclo^{-1}$

comparativamente com os 18 e 32 L CH₄.ciclo⁻¹ produzidos no reactor C, respectivamente. Nas cargas seguintes (V, VI e VII) o reactor B produziu, em média, entre 44 a 80 LCH₄.ciclo⁻¹, enquanto que o reactor C produziu entre 40 a 71 LCH₄.ciclo⁻¹ (ver Tabelas 13, 14 e 15). Nestas cargas, verificou-se uma produção de metano na ordem dos 9, 21 e 13% superiores no reactor B comparativamente com o reactor C, respectivamente. É interessante referir, que foi no final da carga IV que se iniciou o processo de granulação das lamas em todos os reactores em estudo (dados não mostrados). Talvez essa seja a explicação para as melhorias na produção de metano do reactor B.

A explicação para as diferenças entre os reactores intermitentes não é clara. No entanto, poderá estar relacionada com algumas diferenças físicas como a transparência dos reactores. Isto é, as lamas do reactor A estiveram sempre ao escuro devido à presença de material aderido às paredes da camisa de revestimento do reactor (tal como no reactor C). No reactor B, as lamas estiveram à luz, pelo menos inicialmente. Ao longo do tempo, foi-se acumulando material em torno das paredes internas do reactor B, o que resultou no seu escurecimento total no final da carga VII (Figura 11).

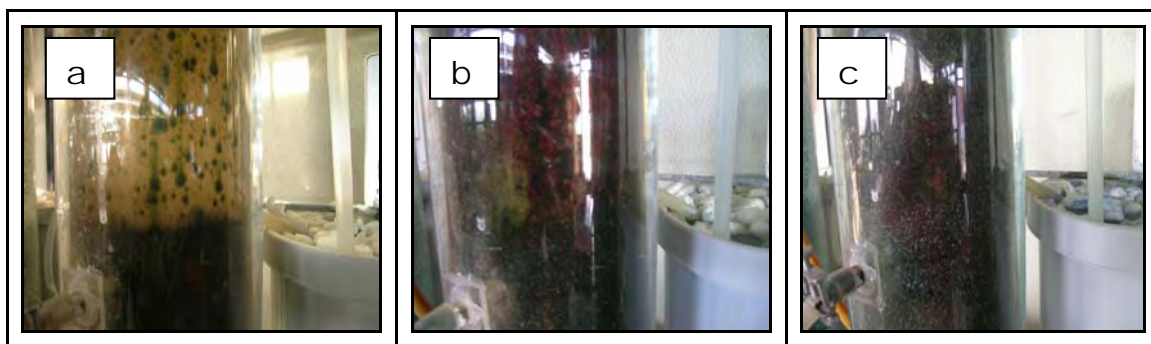


Figura 11. Acumulações de material nas paredes internas do reactor B ao longo das cargas investigadas (Legenda: a, carga III; b, carga V; c, carga VII).

Ao longo dos ciclos operados em cada carga, a produção de metano foi bastante estável nas cargas I à V, em todos os reactores investigados, com excepção apenas do ciclo 1 da carga V, quando se observou um pico de produção de metano no reactor A. Posteriormente, nas cargas VI e VII verificou-se algumas variações em todos os reactores (Figura 9). A estabilização da Bv efectiva também se foi tornando mais difícil ao longo do estudo, porque ligeiras diferenças na CQO e Q de alimentação reflectiam-se em maiores variações da Bv aplicada (Figura 9). Por outro lado, os reactores poderão também ser mais sensíveis a essas variações perante cargas superiores, e por isso, ser necessário mais tempo até que a produção de metano estabilize. A decisão do momento de mudança de carga descrita no capítulo 4 baseou-se na estabilidade da produção de metano, no entanto, nas cargas VI e VII foi sobretudo decidida com base no elevado nº ciclos operados a essas cargas.

5. RESULTADOS

A evolução da % média de metano no biogás e da produção média de metano para cada dia de ciclo dos reactores UASB intermitentes (A e B) e para o reactor contínuo (C) ao longo da Bv aplicada apresenta-se na Figura 12.

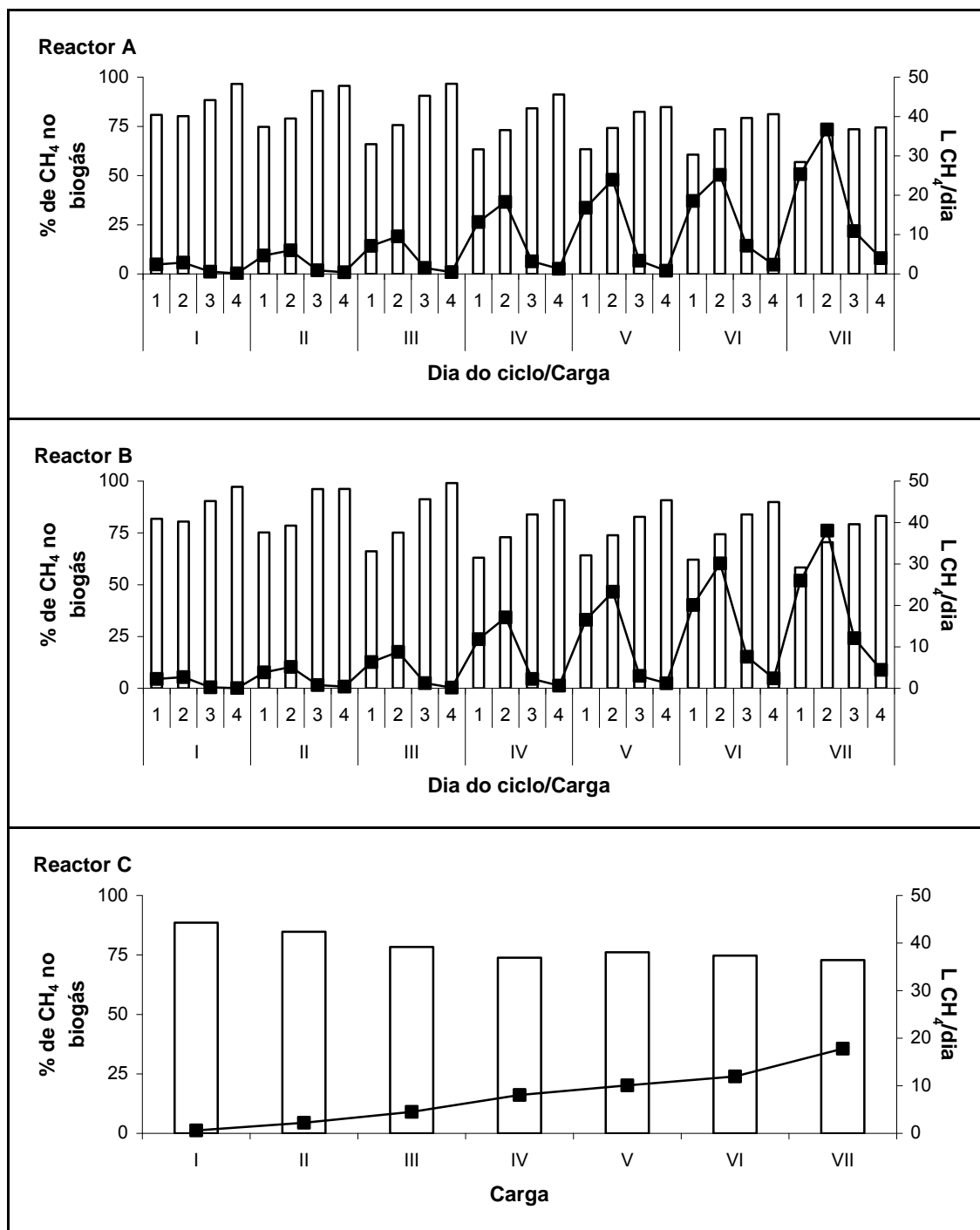


Figura 12. Evolução da percentagem média de metano no biogás e da produção média de metano para cada dia de ciclo dos reactores UASB intermitentes (A e B) e para o reactor contínuo (C) ao longo das cargas aplicadas (Legenda: % de metano no biogás; produção diária de metano).

De uma forma geral, e em termos médios, a % de metano diminuiu com o aumento de carga em todos os reactores, exceptuando um ligeiro aumento nos reactores B (de 77,7% para

77,9%) e C (de 73,8% para 76,1%) da carga IV para a carga V, e que poderá estar relacionado com o início do processo de granulação no final da carga IV. Da carga I à carga VII, a % de metano variou entre 86,5 a 68,9% no reactor A, entre 87,5 a 72,8% no reactor B e entre 88,6 e 72,9% no reactor C (ver Tabelas 13, 14 e 15)..

Ao longo dos quatro dias que compõem o ciclo dos reactores intermitentes, o biogás foi-se tornando cada vez mais rico em metano em todas as cargas investigadas, com excepção apenas da carga I, em que diminuiu ligeiramente no dia 2 em ambos os reactores. Apesar deste aumento observado nos quatro dias que compõem os ciclos, a diferença na % de metano no biogás entre o dia 1 e o dia 4 não foi constante ao longo das cargas investigadas.

No reactor A, enquanto que, a diferença na % de metano no biogás entre o dia 1 e o dia 4 dos ciclos, aumentou na passagem para as cargas II e III, foi diminuindo nas cargas seguintes. A partir da carga V, a maior diferença na % de metano entre os dias dos ciclos passou a verificar-se entre o primeiro e o segundo dia. Pode-se, assim afirmar que, no reactor A, ocorreu uma aproximação nos valores de % de metano no biogás entre os dias dos ciclos, a partir da carga IV, e que as maiores diferenças passaram a ocorrer entre o primeiro e o segundo dia de alimentação a partir da carga V.

No reactor B, a diferença na % de metano no biogás entre o dia 1 e o dia 4 dos ciclos, também aumentou na passagem para as cargas II e III e diminuiu na passagem para as cargas IV e V. À semelhança do reactor A, as maiores diferenças na % de metano passaram a verificar-se entre os dias 1 e 2 a partir da carga V. No entanto, a diferença na % de metano entre o dia 1 e o dia 4 dos ciclos, aumentou na passagem para a carga VI no reactor B, devido a um aumento das diferenças entre os dias dos ciclos. Na carga VII, as maiores diferenças na % de metano voltaram a verificar-se entre os dias 1 e 2 novamente.

A evolução da produção de metano por ciclo ($\text{LCH}_4\cdot\text{ciclo}^{-1}$) ao longo das cargas investigadas foi já comentada durante a análise das Figuras 9 e 10. Da Figura 12 importa ainda salientar que a produção média de metano ao longo dos dias que compõem o ciclo dos reactores intermitentes ($\text{LCH}_4\cdot\text{dia}^{-1}$) variou, de uma forma geral, aumentando durante a fase de alimentação (dias 1 e 2) e diminuindo durante a fase de estabilização (dias 3 e 4), em todas as cargas investigadas. Durante a fase de alimentação, a produção de metano nos reactores intermitentes foi praticamente o dobro da produção de metano no reactor contínuo, descendo abaixo da produção no reactor contínuo durante a fase de estabilização.

Tal como na análise das diferenças na % de biogás entre os dias dos ciclos, as diferenças na produção de metano entre os dias dos ciclos ao longo das cargas também não foi constante. No entanto, enquanto que na % de metano, as diferenças diminuíram, de uma forma geral, a partir da carga III, já as diferenças na produção de metano entre os dias dos ciclos aumentaram desde a carga I até à carga VII em ambos os reactores intermitentes. A única excepção ocorreu no reactor A, na carga VI, quando a produção de metano nos dias 2 e 3 se aproximaram.

5.1.3 EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO E DE METANIZAÇÃO

A evolução da eficiência de remoção por cada ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada e dos ciclos operados a cada carga apresentam-se na Figura 13.

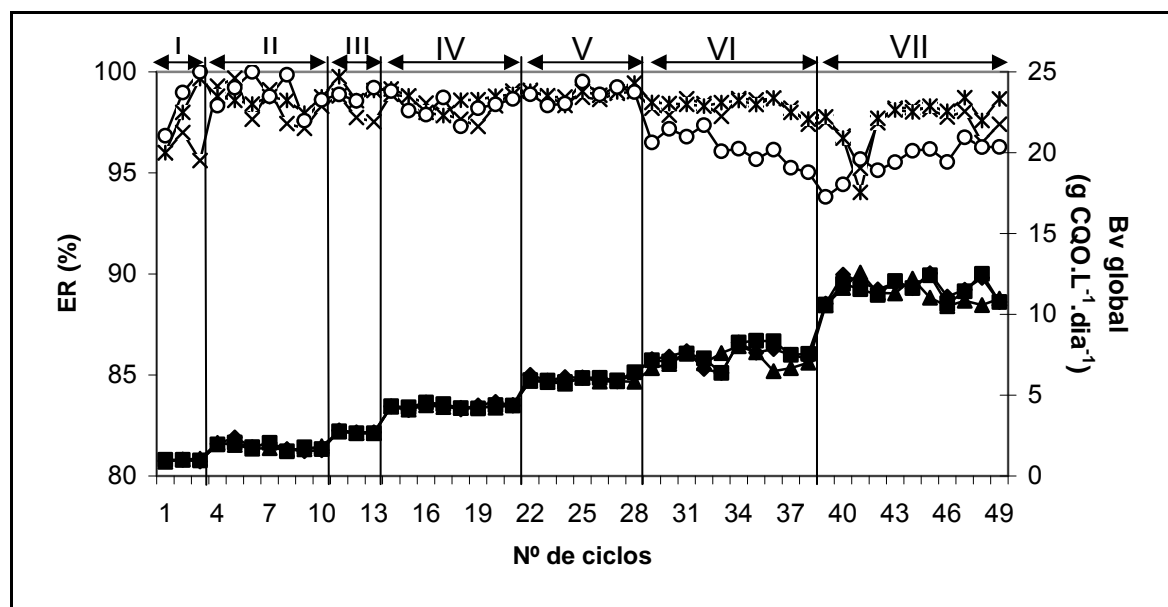


Figura 13. Evolução da eficiência de remoção (E_R) por ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada (Legenda: —x— reactor A; —*— reactor B; —o— reactor C; —▲— Bv aplicada ao reactor A; —■— Bv aplicada ao reactor B; —▲— Bv aplicada ao reactor C).

Da Figura 13, observa-se que, de uma forma geral, todos os reactores apresentaram eficiências de remoção elevadas, superiores a 94%. Ao longo dos ciclos que compõem as cargas, a remoção da CQO foi, no entanto, aumentando e/ou diminuindo dependendo da carga e do reactor, com excepção apenas da carga V, quando se verificou uma eficiência de remoção estável ao longo dos ciclos em todos os reactores.

Durante a operação da carga I, a eficiência de remoção foi aumentando de 96 e 96,8% para 99,7 e 100% nos reactores B e C, respectivamente, enquanto que no reactor A aumentou no ciclo 2 e diminuiu no ciclo 3.

Na passagem para a carga II, a eficiência de remoção do reactor A aumentou de 95,6 para 99,3% no ciclo 1 e para 99,7% no ciclo 2, obtendo-se o seu valor máximo observado ao longo do estudo. Por outro lado, nos reactores B e C, a eficiência de remoção diminuiu ligeiramente para 98,8 e 98,3%, respectivamente, no ciclo 1 desta carga. Durante a operação da carga II, todos os reactores apresentaram aumentos e diminuições, até que no final, as eficiências de remoção foram próximas (A-98,3, B-98,8 e C-98,6%). Foi em ciclos das cargas I e II que o reactor C apresentou o seu valor máximo de eficiência de remoção de 100%.

A carga III foi operada apenas durante 3 ciclos, no entanto, é de destacar, apenas, a diminuição da eficiência de remoção no reactor A de 98,8 para 97,5%.

Durante a carga IV, todos os reactores apresentaram uma eficiência de remoção de 99% no ciclo 1, e que foi diminuindo e aumentando até que, no final, esse valor voltou a repetir-se em todos os reactores.

Dado que a carga que apresentou eficiências de remoção mais estáveis em todos os reactores foi a carga V, pode dizer-se que essa estabilidade se manteve nos reactores intermitentes até ao final da carga VI. Isto porque, durante a carga VI, o reactor contínuo apresentou uma diminuição progressiva da eficiência de remoção desde 99% no último ciclo da carga V até 95% no último ciclo da carga VI, enquanto que nos reactores intermitentes, essa diminuição apenas se verificou a partir do ciclo 9 da carga VI e não foi tão acentuada (de cerca de 98,4% ao longo do ciclo em ambos os reactores para A-97,4 e B-97,6% no último ciclo).

Na passagem para a carga VII, observou-se os valores mínimos de eficiência de remoção para cada reactor ao longo do estudo. Estes valores verificaram-se no ciclo 3 para os reactores intermitentes (A- 95,2 e B- 94%) e no ciclo 1 para o reactor contínuo (93,8%). A eficiência de remoção nos reactores intermitentes, apesar de ter diminuído nos três primeiros ciclos da carga VII, voltou ao seu valor inicial logo no ciclo seguinte e aí se manteve até ao final da carga. A diminuição da remoção da CQO nos reactores intermitentes durante o penúltimo ciclo da carga VII, poderá estar relacionada com o aumento da Bv nesse ciclo, no entanto, quando isso aconteceu no ciclo 7, a eficiência de remoção não foi tão afectada. O reactor contínuo, apresentou um aumento progressivo da eficiência de remoção ao longo da carga VII de 93,8 para 96,3% entre o início e o final da carga, respectivamente (Figura 13). A eficiência de remoção média obtida para cada carga e para cada reactor será apresentada mais adiante.

A evolução da eficiência de metanização por cada ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada e dos ciclos operados a cada carga apresentam-se na Figura 14.

A estabilidade de produção de metano, referida anteriormente, nas cargas I – V, não se reflectiu na estabilidade da metanização da CQO removida para essas mesmas cargas. Acontece que este parâmetro, apesar de depender do metano produzido e da remoção da CQO, parece ser mais sensível que estes parâmetros individualmente. Ao longo dos ciclos que compõem as cargas, a metanização da CQO foi aumentando e/ou diminuindo dependendo da carga e do reactor. Também se observou, por vezes, a ocorrência de alguns picos (aumentos elevados num dos ciclos) na eficiência de metanização.

Ao longo da carga I ocorreu uma diminuição na eficiência de metanização nos reactores B e C, que foi desde 64,3 e 44,8%, no ciclo 1, a 50 e 25,2%, no ciclo 3, respectivamente. Foi neste último ciclo que o reactor B apresentou o seu valor mínimo de eficiência de metanização verificado ao longo do estudo. A diminuição na eficiência de metanização nestes reactores foi acompanhada por uma melhoria na eficiência de remoção ao longo da carga. Pelo contrário, o reactor A não apresentou diminuição na eficiência de metanização no ciclo 3 desta carga, porque diminuiu a sua eficiência de remoção.

Na passagem para a carga seguinte, a eficiência de metanização diminuiu nos reactores A

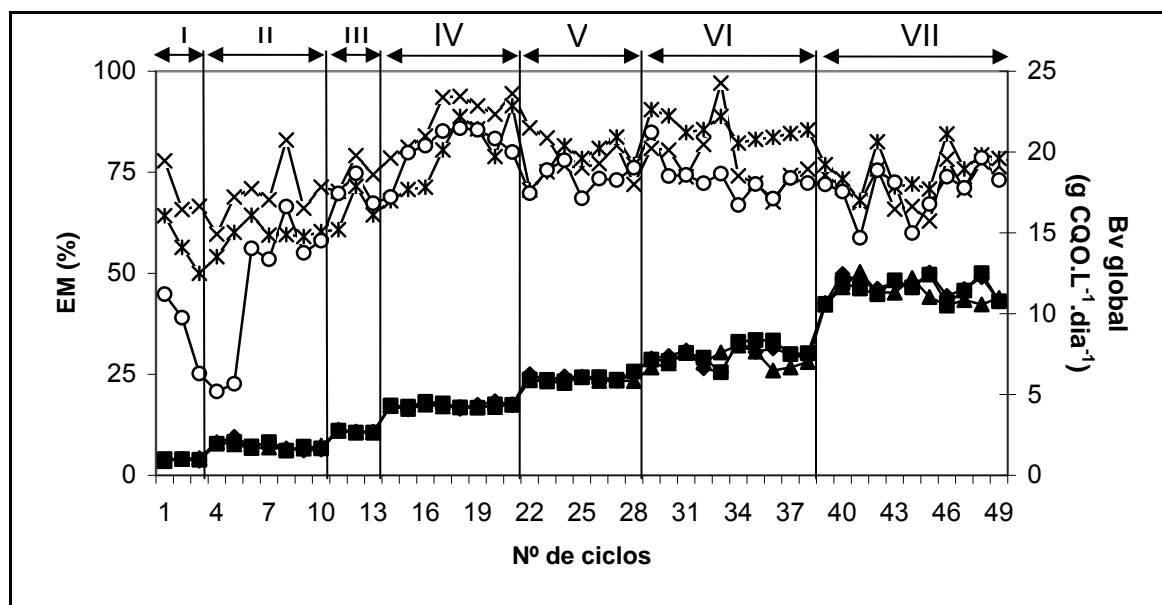


Figura 14. Evolução da eficiência de metanização (E_M) por ciclo de operação dos reatores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada (Legenda: —x— reactor A; —*— reactor B; —o— reactor C; —◆— Bv aplicada ao reactor A; —■— Bv aplicada ao reactor B; —▲— Bv aplicada ao reactor C).

e C, de 66,6 e 25,2%, no último ciclo da carga I, para 59,7 e 20,7%, no primeiro ciclo da carga II, respectivamente. Estes últimos foram os valores mínimos observado para ambos os reatores ao longo do estudo. Por outro lado, o reactor B apresentou um ligeiro aumento de 50 para 54,1% com a mudança de carga. Ao longo da carga II, a evolução da eficiência de metanização nos reatores em estudo também foi diferente. No reactor A, estabilizou em cerca de 70% nos ciclos 2, 3 e 4, apresentou um pico de 83% no ciclo 5, descendo depois para cerca de 70% no final da carga. No reactor B, a eficiência de metanização aumentou progressivamente até 64,3%, no ciclo 3, e estabilizou até ao final da carga em cerca de 60%. No reactor C, o aumento do ciclo 1 até ao ciclo 3 foi brusco (de 20,7 para 56,2%) e também apresentou um pico de 66,5%, no ciclo 5, descendo depois para 58% no final da carga.

Na passagem para a carga III, os reatores intermitentes mantiveram a eficiência de metanização observada no último ciclo da carga anterior, enquanto que no reactor C observou-se um aumento de cerca de 12% com a mudança de carga. Todos os reatores apresentaram um pico no ciclo 2 (A-79,1, B-71,5 e C-74,8%) com posterior descida para 74,4, 64,5 e 67,3%, nos reatores A, B e C, respectivamente.

Na passagem para a carga IV, a eficiência de metanização aumentou em todos os reatores. Nos reatores intermitentes, esse aumento foi progressivo até ao ciclo 3, tendo ocorrido desde 74,4 e 64,5%, observados no último ciclo da carga anterior, até 84 e 71,3% no ciclo 3 da carga IV. No ciclo 4 verificou-se um aumento de cerca de 10% em ambos os reatores. Seguidamente, a eficiência de metanização no reactor A praticamente estabilizou em cerca de 92%, enquanto que no reactor B verificou novo aumento de cerca de 10% no ciclo 5, seguido de uma descida e um pico no final da carga. Este último pico equivaliu ao valor máximo de eficiência

de metanização para o reactor B ao longo do estudo (91,5%). No reactor C, também se observou um aumento de cerca de 10% na eficiência de metanização, embora no ciclo 2. Nos ciclos seguintes, a evolução da eficiência de metanização pode ser descrita por uma curva hiperbólica, aumentando até 85,9% e diminuindo até ao valor final de 80%. O valor máximo de eficiência de metanização para o reactor C ao longo do estudo observou-se para o valor máximo dessa curva.

Na mudança para a carga V, a eficiência de metanização diminuiu em cerca de 10% nos reactores A e C, e em cerca de 20% no reactor B. A diminuição manteve-se no reactor A até ao ciclo 4 (até 76,1%). Nos reactores B e C, após a descida que ocorreu no primeiro ciclo desta carga, a eficiência de metanização aumentou até ao ciclo 3 em cerca de 10 e 9%, respectivamente. Ambos os reactores intermitentes apresentaram um pico na eficiência de metanização no ciclo 6 de 81,6 e 83,7% ao qual se seguiu uma descida para 72 e 76,9%, nos reactores A e B, respectivamente. O reactor C, apresentou uma eficiência de metanização estável nos três últimos ciclos da carga V em cerca de 74%.

Durante a carga VI, e apesar do aumento na eficiência de metanização observada em todos os reactores após a mudança de carga, observou-se uma diminuição progressiva na eficiência de metanização dos reactores A e C, de 80,1 e 84,9%, no ciclo 1, para 75,8 e 72,3%, no final da carga, respectivamente. Apesar disso, ocorreu um pico no reactor A, no ciclo 5, com o valor de 97,1%, equivalente ao seu máximo observado ao longo do estudo. No reactor B, a eficiência de metanização sofreu algumas oscilações ao longo dos ciclos que compõem a carga, nomeadamente com a ocorrência de um pico no ciclo 5 (88,8%), possivelmente devido à diminuição da B_v aplicada aos reactores intermitentes nesse ciclo ($6,3 \text{ mg CQO}_T \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$). A partir do ciclo 6, a eficiência de metanização neste reactor aumentou progressivamente de 82,2 para 85,5%, no final do ciclo.

Na passagem para a carga VII, a eficiência de metanização manteve-se praticamente igual à do último ciclo da carga anterior nos reactores intermitentes. O reactor C sofreu uma descida de cerca de 9%. Ao longo dos ciclos que compõem esta carga, a eficiência de metanização oscilou com grande amplitude em todos os reactores. No final da carga VII observou-se uma eficiência de metanização de 78,4% no reactor B, 76,4% no reactor A e de 73% no reactor C (Figura 14).

A eficiência média de remoção e metanização para a fase de alimentação (alim) e para os ciclos (global) de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e para o reactor contínuo (C) ao longo das cargas operadas apresenta-se na Figura 15. Os valores obtidos no global dos ciclos de operação dos reactores UASB intermitentes são a base de comparação com o reactor contínuo e, por isso, foram identificados com a mesma cor no gráfico.

Como é possível observar a partir da Figura 15, e considerando apenas o global dos ciclos, a eficiência média de remoção foi igual ou superior a 98% em todos os reactores e em praticamente todas as cargas. Como excepção, teve-se as cargas I (A-96,2%) e II (A-97,4 e B-97,6%), nos reactores intermitentes, e as cargas VI (C-96,2%) e VII (C-95,6%), no reactor contínuo. Neste último, verificou-se uma diminuição na eficiência média de remoção a partir da

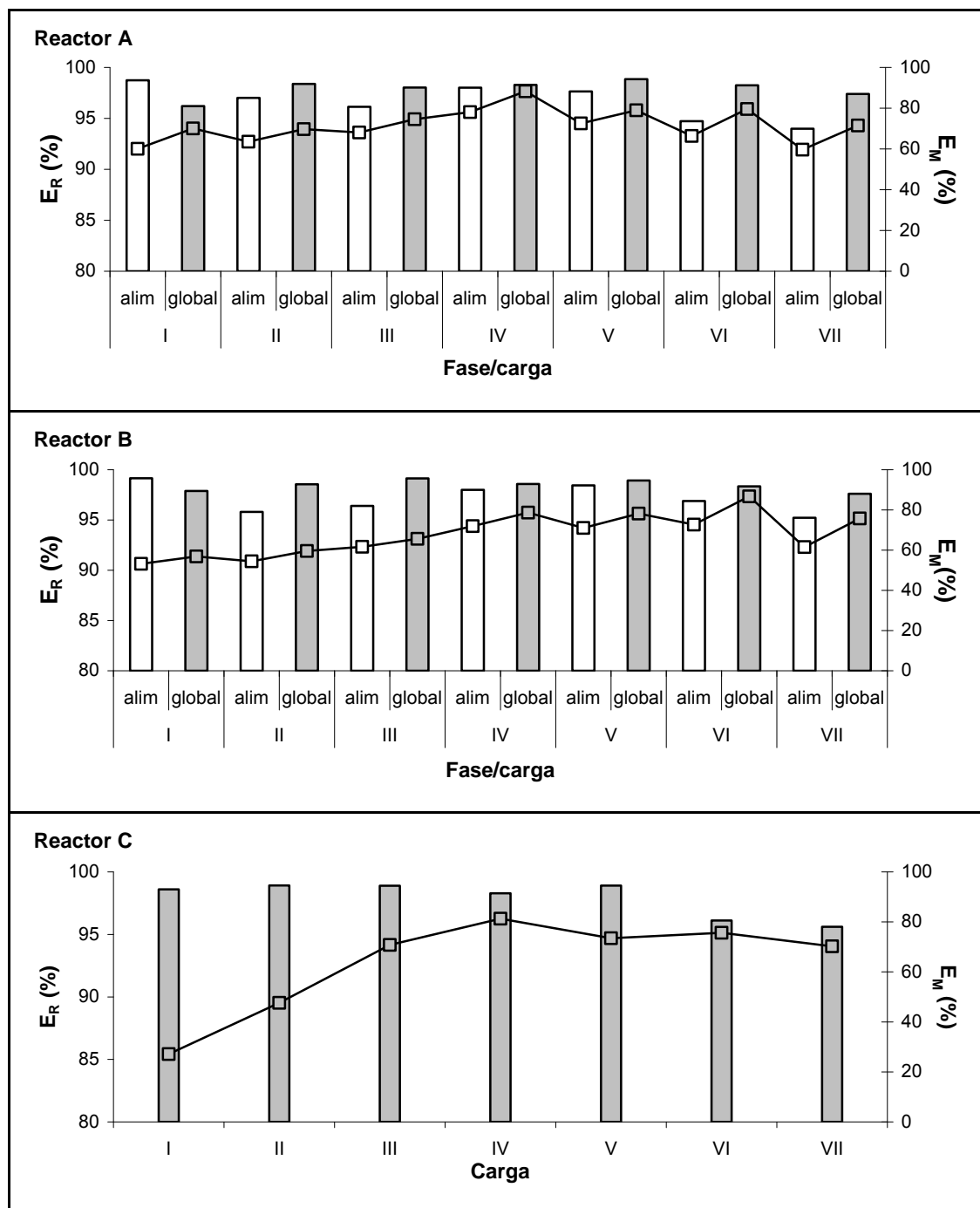


Figura 15. Evolução das eficiências médias de remoção (E_R) e metanização (E_M) para a fase de alimentação (alim) e o global dos ciclos de operação dos reatores UASB intermitentes (A e B) e para o reactor contínuo (C) ao longo das cargas aplicadas (Legenda: \square E_R na fase de alimentação; \blacksquare E_R no global; \square E_M na fase de alimentação; \blacksquare E_M no global).

carga VI (ver Tabelas 13, 14 e 15). Comparativamente, a eficiência média de remoção no reactor A foi inferior à do reactor C nas cargas I, II e III (0,5-2,5%), semelhante nas cargas IV e V, e superior nas cargas VI e VII (cerca de 2%). No reactor B, a eficiência média de remoção foi ligeiramente inferior à do reactor C nas cargas I e II (0,4-0,7%), semelhante nas cargas III, IV e V, e superior também nas cargas VI e VII (cerca de 2%). O reactor B apresentou eficiências de

remoção da CQO sempre semelhantes ou ligeiramente superiores ao reactor A. Esta diferença foi mais visível na primeira carga operada (cerca de 2%) (ver Tabelas 13, 14 e 15).

Relativamente à eficiência média de metanização, é possível observar, a partir da Figura 15, e considerando apenas o global dos ciclos, que o perfil da eficiência média de metanização ao longo das cargas apresenta algumas diferenças e semelhanças entre os reactores intermitentes e contínuo. Tanto no reactor B como no reactor C, observou-se um incremento na eficiência de metanização até à carga IV. No caso do reactor B, a eficiência média de metanização aumentou de 56,9 para 78,7%, o que equivaleu a um incremento de cerca de 22%. No caso do reactor C, eficiência média de metanização aumentou de 27,1 para 81,3% (valor médio mais elevado), o que equivaleu a um incremento superior, de cerca de 54%. No reactor A, o incremento observou-se apenas a partir da carga II até à carga IV, e foi desde 69,7 para 88,3% (valor médio mais elevado), o que equivaleu a um incremento de cerca de 19%. Na carga V, observou-se uma diminuição na eficiência média de metanização nos reactores A e C, para 79 e 73,5%, o que equivaleu a uma diminuição de cerca de 9 e 8%, respectivamente. No reactor B, a variação entre a carga IV e V foi de apenas 0,5%, por isso, considerou-se que não diminuiu verdadeiramente. Na carga VI, novamente os reactores A e C, apresentaram o mesmo perfil, mantendo a eficiência média de metanização, com variações na ordem dos 0,6 e 2%, respectivamente. Já o reactor B, apresentou um aumento de 78,2 para 86,7%, o que equivaleu a um incremento de cerca de 9%, e apresentou a sua eficiência média de metanização mais elevada ao longo do estudo. Na carga VII, a eficiência média de metanização diminuiu em todos os reactores. No reactor A diminuiu de 79,6 para 71,5%, o que equivaleu a uma diminuição de cerca de 8%; no reactor B diminuiu de 86,7 para 75,7%, o que equivaleu a uma diminuição de cerca de 12%; e no reactor C diminuiu de 75,7 para 70,3%, o que equivaleu a uma diminuição de cerca de 5%. Apesar da menor diminuição no caso do reactor C, a eficiência de metanização nos reactores intermitentes permaneceu mais elevada que este (ver Tabelas 13, 14 e 15).

Comparativamente, a eficiência média de metanização, no global, no reactor A foi sempre superior à do reactor C. Essa diferença variou entre 32 e 48% nas cargas I e II, entre 5 e 8% nas cargas III, IV, V e VI, e em 2% na última carga. Comparativamente com o reactor A, o reactor B não apresentou diferenças tão elevadas com o reactor C nas duas primeiras cargas (entre 20 a 36% superior que o reactor C), chegou mesmo a apresentar eficiências de metanização inferiores ao reactor C nas cargas III e IV (entre 2 a 7% inferior ao reactor C), aproximou-se do reactor A durante a carga V (6% superior ao reactor C) e superou o reactor A nas cargas VI e VII (entre 12 e 6% superior ao reactor C). Este perfil é semelhante ao perfil de produção de metano referido anteriormente, mas diferente da eficiência de remoção. Ou seja, é possível resumir que o reactor B apresentou nas duas últimas cargas investigadas um desempenho superior ao do reactor C no que se refere tanto à remoção da CQO como à sua conversão a metano. O reactor A, apesar de ter removido menos CQO que o reactor C nas cargas I, II, III e V, verificou sempre uma eficiência de metanização superior para essas cargas. Nas duas últimas cargas, o reactor B foi, no entanto,

superior ao reactor A no que se refere à eficiência de metanização, e foi, em todas as cargas, ligeiramente superior na remoção da CQO (ver Tabelas 13, 14 e 15).

As diferenças que se estabelecem entre a eficiência de remoção e metanização na fase de alimentação e no global dos ciclos dos reactores intermitentes são úteis para o entendimento da importância da fase de estabilização no desempenho destes reactores. Da Figura 15 importa salientar que a eficiência de remoção foi, no global dos ciclos, muito semelhante com a eficiência de remoção obtida no final da fase de alimentação. Na fase de alimentação foram removidas entre 94,7-98,8% e 95,2-99,2% da CQO fornecida nos reactores A e B, respectivamente, ao longo das cargas investigadas. A importância, em termos percentuais, da fase de estabilização na remoção global da CQO não foi constante ao longo das cargas investigadas. No reactor A, a sua importância foi superior nas cargas VI e VII, contribuindo para a remoção de cerca de 3-3,5% da CQO removida no global. No reactor B, a sua importância foi superior nas cargas II e III quando contribuiu para a remoção de cerca de 3% da CQO removida no global. Na carga I, observou-se mesmo uma diminuição entre a CQO removida durante a alimentação e a obtida para o global dos ciclos.

A eficiência de metanização observada na fase de alimentação e no global dos ciclos apresentou diferenças superiores às da eficiência de remoção. Os reactores A e B apresentaram, respectivamente, eficiências de metanização na fase de alimentação entre 59,7-78,9% e 53,2-72,7%. A importância, em termos percentuais, da fase de estabilização na metanização global da CQO foi, por isso, superior à da remoção, mas também não foi constante ao longo das cargas investigadas. No reactor A, a eficiência de metanização na fase de estabilização variou entre 6 a 13%, nas cargas II e VI, respectivamente, tendo diminuído ligeiramente com a passagem para a carga VII (12%). No reactor B, variaram entre 4 e 14%, nas cargas I e VI-VII, respectivamente. Comparando ambos os reactores intermitentes, parece que o melhor desempenho do reactor B nas duas últimas cargas, também reflectiu ligeiramente melhores eficiências de remoção da CQO na fase de alimentação (entre 98,5 a 97,6% do global) e melhores eficiências de metanização na fase de estabilização (cerca de 14% do global).

A diferença que se estabelece entre a eficiência de remoção e de metanização na fase de alimentação e no global refere-se à CQO que ficou retida nos reactores durante a fase de alimentação e que foi posteriormente convertida a metano durante a fase de estabilização. O melhor desempenho do reactor B nas duas últimas cargas reflectiu por isso, uma maior retenção da CQO durante a fase de alimentação e uma melhor metanização dessa CQO durante a fase de estabilização e que foi responsável por cerca de 12,5-12% da eficiência de metanização global, comparativamente com os 10-8,5% observados no reactor A.

5.1.4 pH, ALCALINIDADE E AOV'S

A evolução do pH no efluente de saída no final de cada ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada e dos ciclos operados em cada carga apresenta-se na Figura 16.

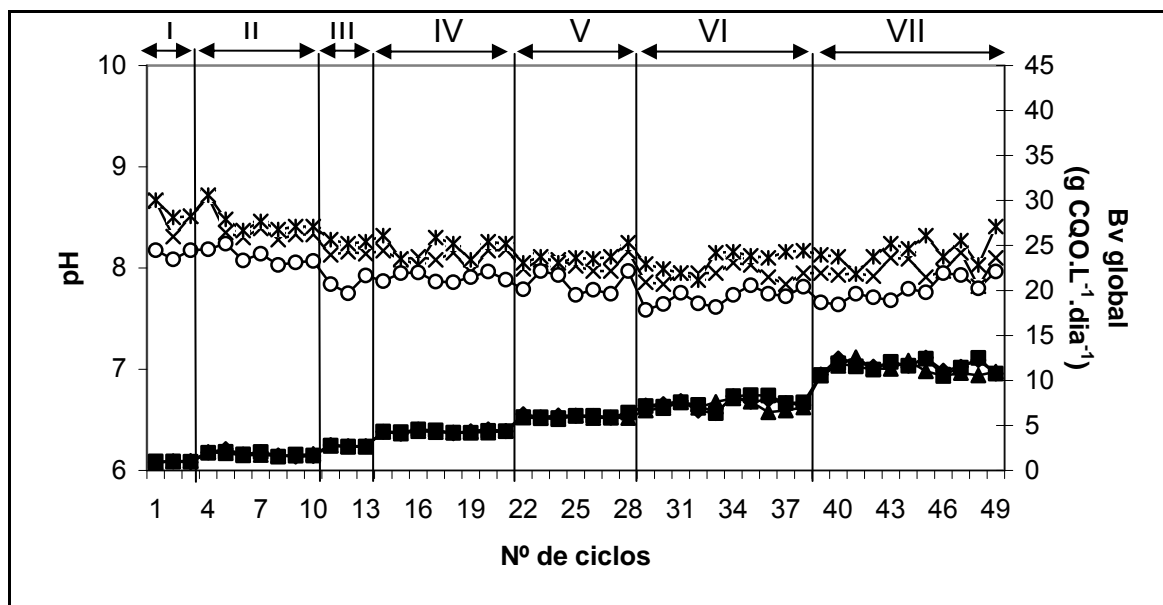


Figura 16. Evolução do pH no efluente de saída no final de cada ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada (Legenda: —x— reactor A; —*— reactor B; —o— reactor C; —x— Bv aplicada ao reactor A; —■— Bv aplicada ao reactor B; —▲— Bv aplicada ao reactor C).

O pH no efluente de saída foi, de uma forma geral, estável, ou seja, sem grandes oscilações em todos os reactores e ao longo das cargas aplicadas (Figura 16). Da Figura 16, é evidente que os reactores intermitentes apresentaram valores de pH superiores ao reactor contínuo em todas as cargas investigadas, dos quais o reactor B demonstrou as maiores diferenças. A média dos valores de pH obtidos para cada carga apresenta-se mais adiante.

A evolução da alcalinidade no efluente de saída no final de cada ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada e dos ciclos operados a cada carga apresenta-se na Figura 17.

A alcalinidade no efluente de saída foi, ao contrário do pH, bastante irregular ao longo dos ciclos operados em cada carga investigada. A observação de picos de alcalinidade no efluente de saída ocorreu sobretudo nos reactores intermitentes, em todas as cargas, excepto na carga I onde foi possível observar um incremento nítido, e na carga III quando foi bastante estável. O reactor C apresentou, à semelhança dos reactores intermitentes um incremento da alcalinidade no efluente de saída durante a carga I, no entanto, os picos de alcalinidade verificaram-se desde a carga IV até à carga VII (Figura 17). Da Figura 17, importa ainda salientar que, tal como no pH, a alcalinidade nos reactores intermitentes foi sempre superior à do reactor contínuo. Neste caso, a diferença foi bastante maior, aproximando-se apenas quando houve descidas na alcalinidade dos reactores intermitentes.

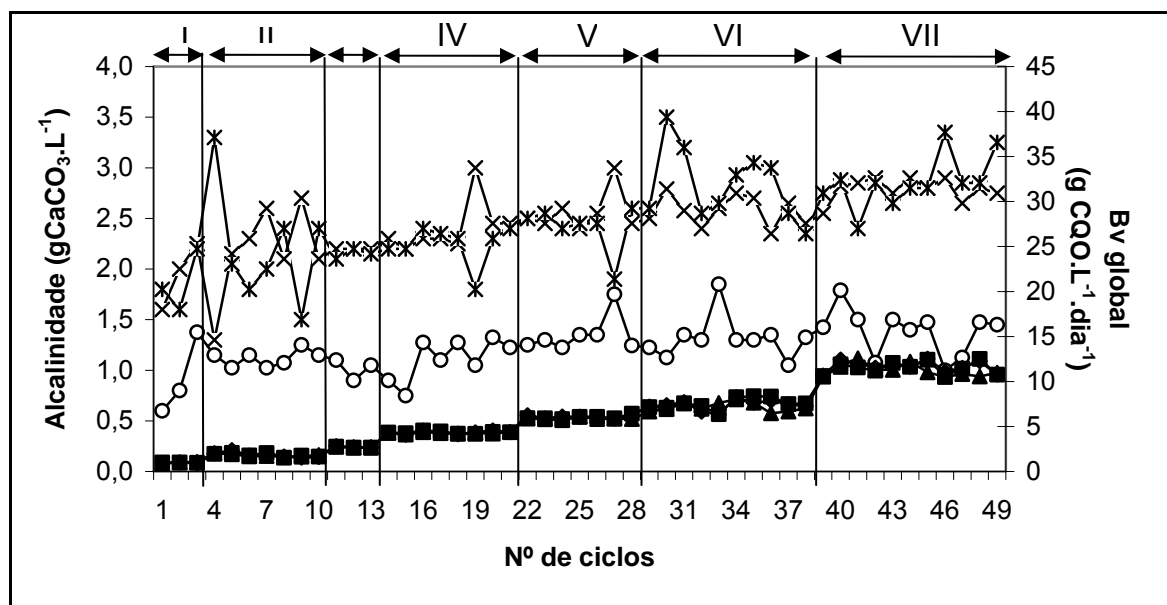


Figura 17. Evolução da alcalinidade no efluente de saída no final de cada ciclo de operação dos reatores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada (Legenda: —x— reactor A; —*— reactor B; —o— reactor C; —■— Bv aplicada ao reactor A; —■— Bv aplicada ao reactor B; —▲— Bv aplicada ao reactor C).

A média dos valores de pH e alcalinidade obtidos para a fase de alimentação (alim) e para os ciclos (global) de operação dos reatores UASB intermitentes (A e B) e para o reator contínuo (C) ao longo das cargas operadas apresenta-se na Figura 18.

Como é possível observar a partir da Figura 18, e em termos globais, observou-se que o pH foi diminuindo desde a carga I até à carga VI nos reatores intermitentes: de 8,49 e 8,56 para 7,93 e 8,07, nos reatores A e B respectivamente. Na carga VII, ambos os reatores apresentaram uma ligeira subida no pH do efluente de saída, para 7,99 no reator A e para 8,17 no reator B. Em termos médios, o pH do efluente de saída do reator C não verificou a mesma relação que os reatores intermitentes ao longo das cargas aplicadas. O pH deste reator diminuiu entre as cargas I e III (de 8,15 para 7,84), aumentou ligeiramente na carga IV (para 7,91), desceu nas cargas V e VI (para 7,85 e 7,71) e voltou a aumentar na última carga (para 7,79).

Relativamente ao pH, é ainda possível observar a partir da Figura 18, que o pH no final da fase de alimentação foi sempre inferior ao pH no final do ciclo, sobretudo até à carga III, em ambos os reatores intermitentes. Essas diferenças ocorreram na ordem das 0,15-0,26 unidades de pH. A partir dessa carga, as diferenças entre a fase de alimentação e o final do ciclo parecem ter atenuado, com a excepção de um ligeiro aumento nas diferenças na carga V para o reator A (de 7,89 para 8,04) e na carga VII para o reator B (de 8 para 8,17).

Em termos médios, e no global, a alcalinidade foi aumentando no reator A ao longo de todas as cargas investigadas (de 1,95 a 2,79 g $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$) (Figura 18). No reator B, também se observou um aumento da alcalinidade ao longo das cargas (de 1,87 a 2,86 g $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$), com excepção da carga III, em que diminuiu ligeiramente de 2,21 para 2,15 g $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, comparativamente com a carga II. As diferenças na alcalinidade entre os reatores intermitentes

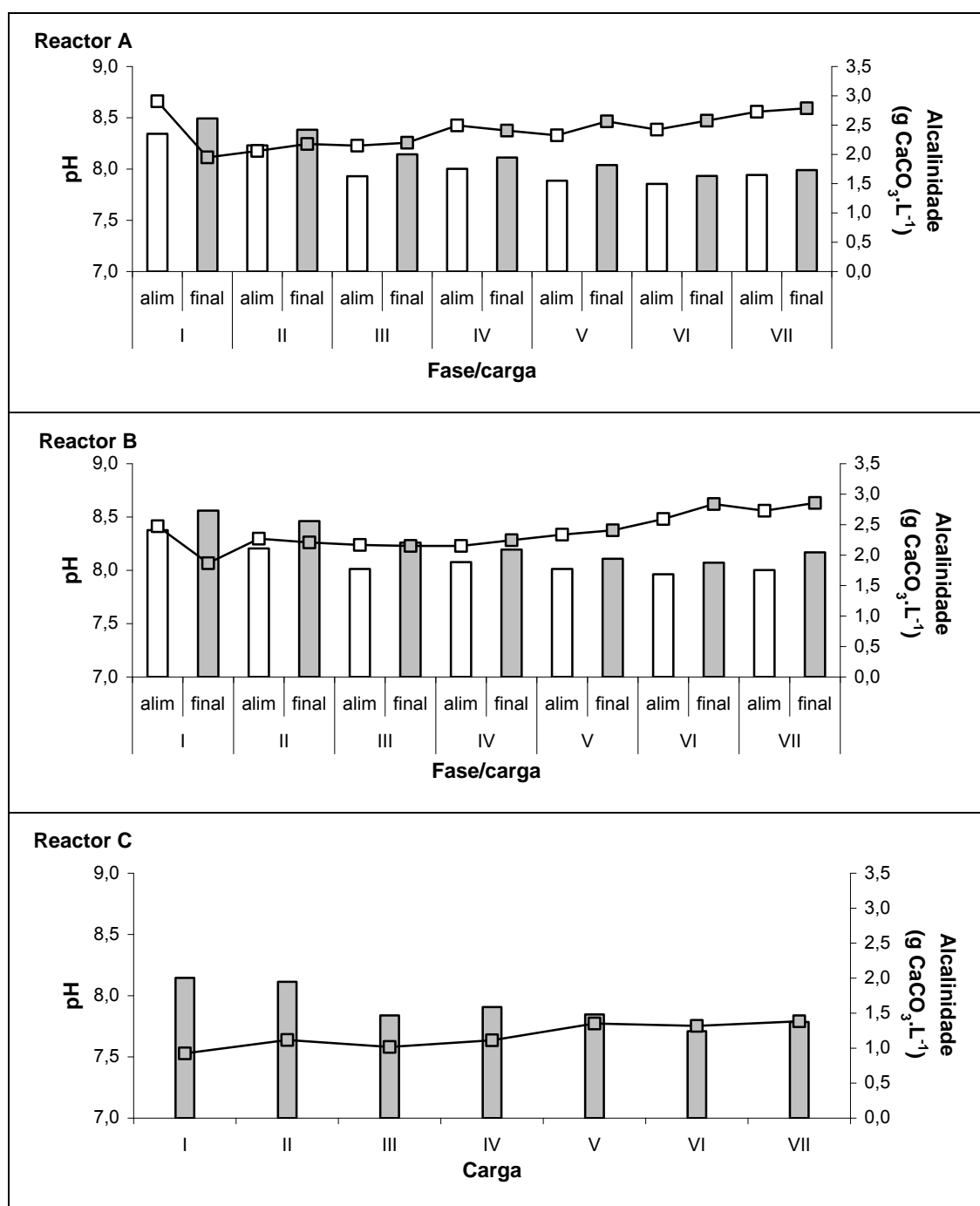


Figura 18. Evolução do pH e alcalinidade médios do efluente de saída no final da fase de alimentação (alim) e no final dos ciclos de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e reactor contínuo (C) ao longo das cargas aplicadas (Legenda: □ pH no final da fase de alimentação; ■ pH no final do ciclo; —□— alcalinidade no final da fase de alimentação; —■— alcalinidade no final do ciclo).

tornaram-se mais evidentes nas cargas mais elevadas. Nas cargas IV e V, o reactor A apresentou uma alcalinidade superior e nas cargas VI e VII foi o reactor B (ver Tabelas 13, 14 e 15). Em termos médios, a alcalinidade do efluente de saída do reactor C foi aumentando e diminuindo ligeiramente ao longo das cargas investigadas. À semelhança do pH, e ao contrário dos reactores intermitentes, não apresentou um comportamento constante. Pode-se, no entanto referir que,

desde a primeira até à última carga, verificou um aumento de $0,93 \text{ g CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ para $1,38 \text{ g CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$).

Relativamente à alcalinidade, é ainda possível observar para o reactor B uma curva desde a carga II até à carga V, em que as diferenças entre a alcalinidade na fase de alimentação e no final do ciclo foram mínimas. No início do estudo, a alcalinidade diminuiu com a fase de estabilização, enquanto que nas cargas VI e VII aumentou (de $2,59$ para $2,84 \text{ g CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ e de $2,73$ para $2,86 \text{ g CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente). No reactor A, as diferenças de alcalinidade entre a fase de alimentação e o final do ciclo não apresentaram um padrão definido, aumentando e diminuindo consoante a carga investigada. Pode-se apenas referir que a alcalinidade aumentou, de forma generalizada, com a fase de estabilização a partir da carga V (Figura 18).

A evolução da concentração de AOV's no efluente de saída no final de cada ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada e dos ciclos operados em cada carga apresenta-se na Figura 19.

Na carga II, o reactor A apresentou uma ligeira acumulação de AOV's que começou no ciclo 2 e terminou com a ocorrência de um pico no total de AOV's (AOV_T) no ciclo 3 ($67 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$). Este pico deveu-se à presença dos ácidos propiónico ($26,1 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$), capróico ($22,2 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$), n-butírico ($10 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$) e n-valérico ($8,7 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$). Ainda na carga II, o reactor C apresentou uma acumulação no total de AOV's no último ciclo da carga ($31,5 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$). Este pico deveu-se à presença dos ácidos capróico ($19,6 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$), n-valérico ($7,5 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$) e n-butírico ($4,5 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$).

Na carga III, enquanto que o reactor A apresentou um pico de acumulação de AOV's de $43,3 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$, no ciclo 3, os outros reactores não apresentaram picos de acumulação. Nesse ciclo, a concentração de AOV's no efluente de saída dos reactores B e C aumentou de 0, no ciclo 2, para $15,1$ e $8,2 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Estes aumentos deveram-se à acumulação dos ácidos iso-valérico> capróico> n-valérico, no reactor A; de ácido capróico> iso-valérico, no reactor B; e n-valérico> iso-valérico> capróico no reactor C.

Na carga IV, observou-se a ocorrência de um pico no total de AOV's nos reactores intermitentes durante o ciclo 5 dessa carga (reactor A- $53,1$ e B- $85,4 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$). Em ambos os reactores, esse pico deveu-se à acumulação de ácido acético e n-butírico, e na proporção de 10 acético: 3 n-butírico.

Na carga V, apesar dos picos de acumulação no total de AOV's, no reactor A, tenham sido inferiores ao pico verificado na carga anterior, nesta carga ocorreram dois picos de acumulação. Esses picos verificaram-se nos ciclos 2 ($32,1 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$) e 3 ($30,2 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$). Enquanto que no ciclo 2 o pico se deveu à acumulação dos ácidos propiónico>n-valérico, no ciclo 2, o ácido n-valérico passou a ser maioritário e a presença de ácido propiónico foi substituída pela do ácido capróico. No reactor B, os picos de acumulação no total de AOV's verificaram-se nos ciclos 3 ($45,2 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$) e 6 ($17,9 \text{ mg Ac}\cdot\text{L}^{-1}$). Enquanto que no ciclo 3, o pico se deveu à acumulação dos ácidos iso- e n- valérico (na mesma proporção), já no ciclo 6 se deveu apenas à acumulação de ácido capróico. Os picos verificados no reactor C, na carga V, foram diminuindo entre os ciclos 3

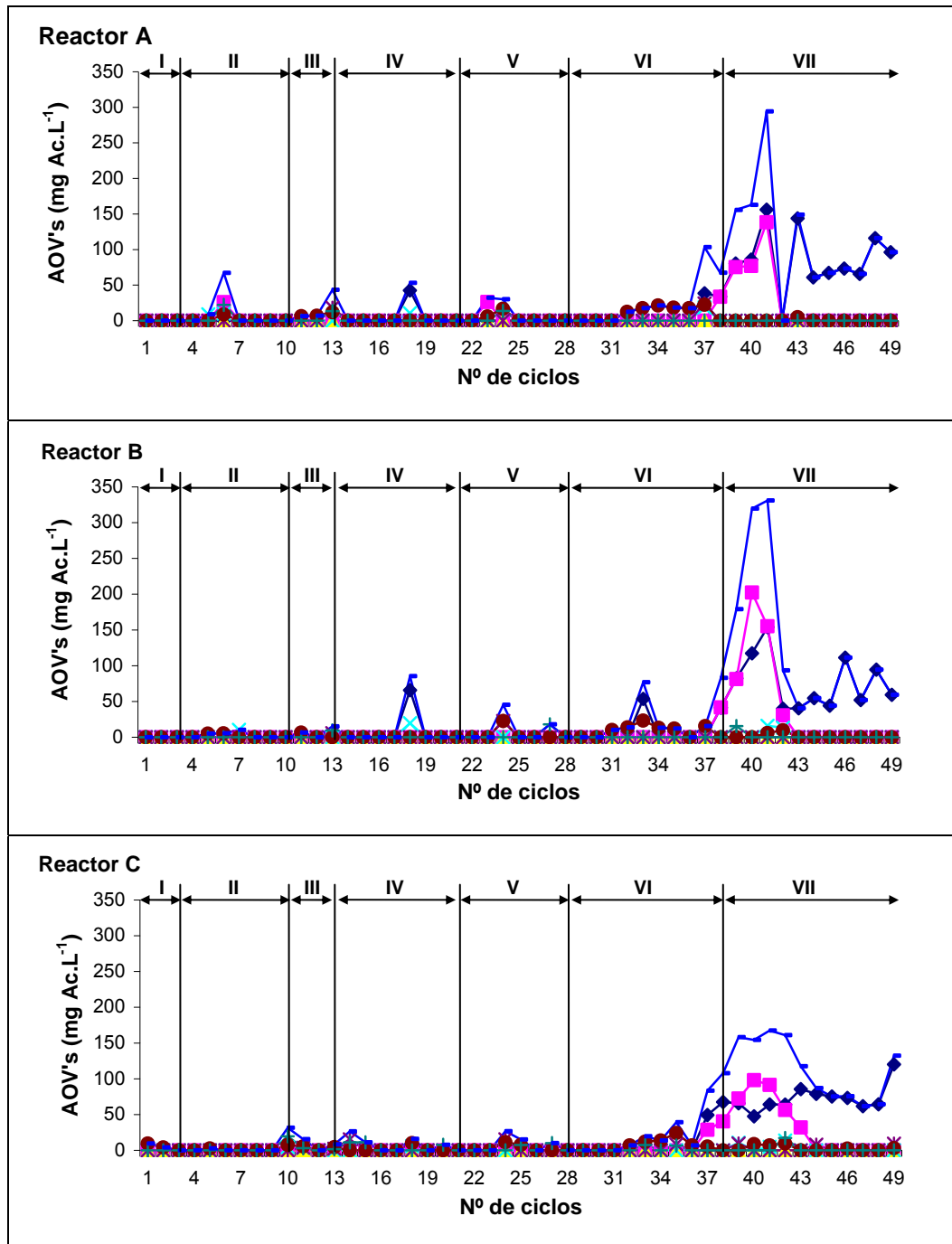


Figura 19. Evolução dos AOV's no efluente de saída no final de cada ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e contínuo (C) ao longo da Bv aplicada (Legenda: — total de aov's, — ácido acético, — ácido propiónico, — ácido iso-butírico, — ácido n-butírico, — ácido iso-valérico, — ácido n-valérico, — ácido capróico).

(26,7 mg Ac.L⁻¹), 4 (15,2 mg Ac.L⁻¹) e 6 (10,1 mg Ac.L⁻¹). Tal como no reactor B, no ciclo 3, o pico deveu-se à acumulação dos ácidos iso- e n-valérico (praticamente na mesma proporção), no ciclo 4, o ácido capróico parece ter substituído o ácido iso-valérico, até que no ciclo 6, o pico deveu-se apenas à presença do ácido capróico, tal como no reactor B novamente.

Até à carga V, os picos de acumulação de AOV's foram sempre inferiores a 100 mg Ac.L⁻¹. No final da carga VI, a acumulação de AOV's atingiu este valor nos reactores A (penúltimo ciclo) e

C (último ciclo). Ao longo dos ciclos operados na carga VI, o reactor A apresentou uma acumulação de AOV's que se iniciou a partir do ciclo 4. Dos ciclos 4 a 8, a acumulação do total de AOV's neste reactor foi baixa, variou entre 12,3 a 21,3 mg Ac.L⁻¹, e deveu-se à acumulação do ácido n-valérico apenas. No ciclo 9, quando a acumulação do total de AOV's atingiu o valor de 103,3 mg Ac.L⁻¹, o ácido acético apareceu como o AOV maioritário (38,4 mg Ac.L⁻¹), seguido dos ácidos iso-valérico (24,2 mg Ac.L⁻¹), n-valérico (22,3 mg Ac.L⁻¹) e n-butírico (18,5 mg Ac.L⁻¹). No ciclo seguinte, o total de AOV's desceu para 67,4 mg Ac.L⁻¹ e caracterizou-se pela presença dos ácidos acético e propiónico na mesma proporção. No reactor B, a acumulação de AOV's iniciou-se a partir do ciclo 3. Do ciclo 3 até ao ciclo 9, o ácido n-valérico foi o único AOV detectado, com excepção do pico no total de AOV's que ocorreu no ciclo 5 (78,9 mg Ac.L⁻¹) onde o ácido acético apresentou uma concentração superior ao n-valérico, e com excepção do ciclo 8 onde não foram detectados AOV's no efluente de saída. No ciclo 10 ocorreu um segundo pico no total de AOV's para esta carga (82,9 mg Ac.L⁻¹) e que se caracterizou pelo desaparecimento do ácido n-valérico e aparecimento dos ácidos acético e propiónico na mesma proporção, tal como aconteceu no reactor A. No reactor C, a acumulação de AOV's iniciou-se no ciclo 4, à semelhança do reactor A, e caracterizou-se pela presença maioritária do ácido n-valérico até ao ciclo 9. No ciclo 9, o ácido acético apareceu como o AOV maioritário (49,3 mg Ac.L⁻¹), tal como no reactor A, seguido do propiónico (28,7 mg Ac.L⁻¹) e n-valérico (5,3 mg Ac.L⁻¹). No último ciclo desta carga, o reactor C verificou uma acumulação no total de AOV's de 107,9 mg Ac.L⁻¹. Tal como nos reactores intermitentes, essa acumulação deveu-se aos ácidos acético e propiónico, no entanto o ácido acético foi maioritário (10ácético:6propiónico).

Na carga VII, todos os reactores verificaram uma acumulação no total de AOV's superior às cargas anteriores. Essa acumulação foi superior nos primeiros ciclos depois da mudança de carga, tendo verificado uma descida que chegou mesmo a zero no caso do reactor A, e picos de acumulação posteriores, ao longo dos ciclos que compõem a carga. Os máximos de acumulação no total de AOV's ocorreram no ciclo 3 para os reactores intermitentes (A- 294,3 e B- 331,0 mg Ac.L⁻¹) e no ciclo 1 para o reactor C (158,3 mg Ac.L⁻¹). O reactor B foi o reactor com o máximo de acumulação mais elevado, seguido do reactor A, e do reactor C, cujo máximo foi cerca de metade do valor dos reactores intermitentes. Em todos os reactores, a seguir à mudança de carga, a concentração de ácido propiónico aumentou até aos valores de 138,3 mg Ac.L⁻¹ no reactor A, 202,3 mg Ac.L⁻¹ no reactor B e até 98,2 mg Ac.L⁻¹ no reactor C. Posteriormente diminuiu até deixar de aparecer no efluente de saída a partir do ciclo 4 no reactor A, do ciclo 5 no reactor B e do ciclo 6 no reactor C. Enquanto que no reactor A, a presença deste ácido ocorreu sempre nas mesmas proporções que o ácido acético, nos reactores B e C chegou a ser superior ao ácido acético em alguns casos. No reactor B, ocorreu na proporção de 10 ácido propiónico: 6 ácido acético no ciclo 2, e no reactor C, na proporção de 10 ácido propiónico: 5 ácido acético no ciclo 2 e de 10 ácido propiónico: 7 ácido acético no ciclo seguinte.

A média da concentração de AOV's no final da fase de alimentação (alim) e no final dos ciclos de operação dos reactores UASB intermitentes (A e B) e no reactor contínuo (C) ao longo

das cargas operadas apresenta-se na Figura 20. Nesta Figura também foram incluídos os perfis médios de AOV's obtidos e a razão AOV_T/Alcalinidade (A/A) para a interpretação dos resultados de alcalinidade em função da concentração do total de AOV's do efluente de saída.

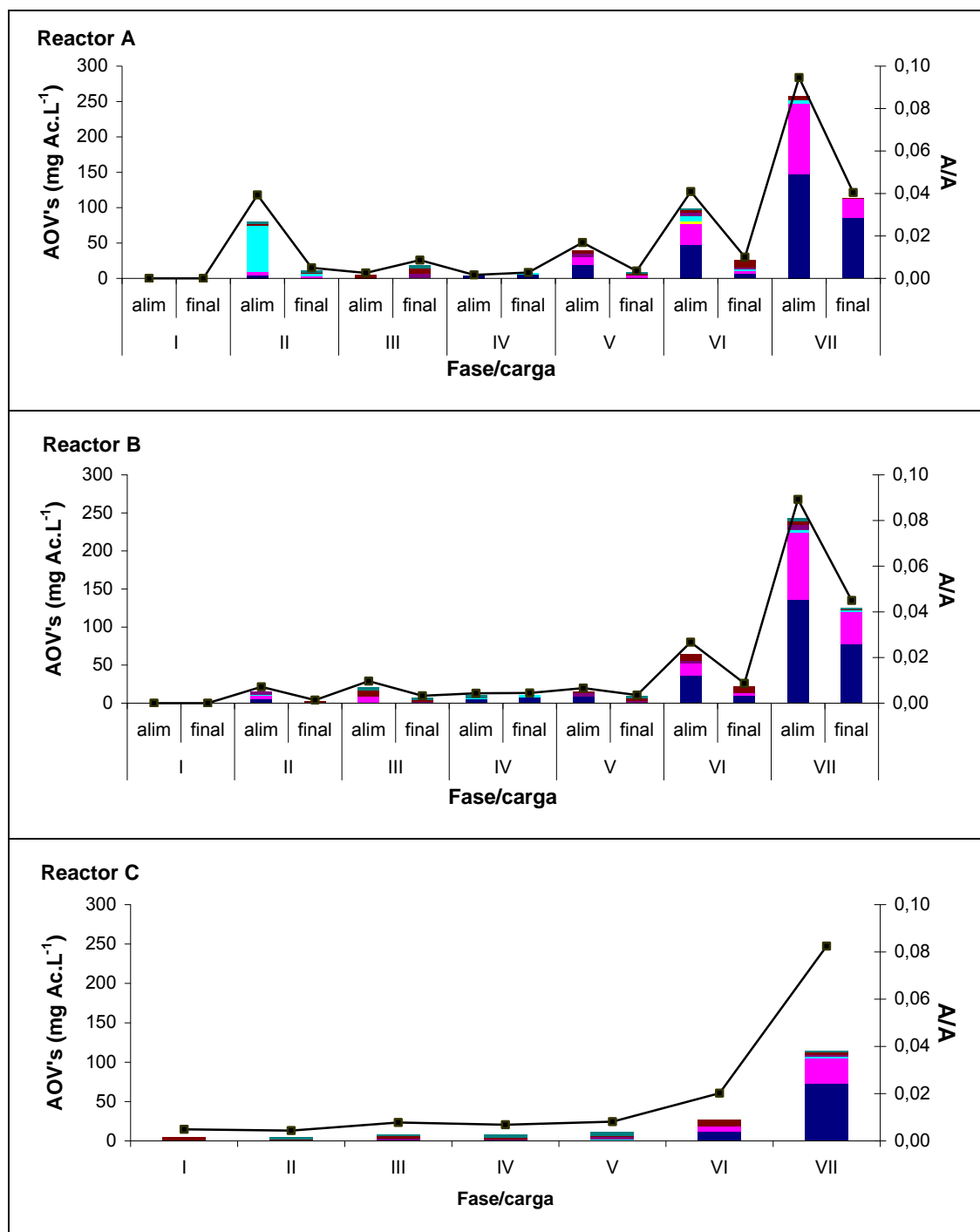


Figura 20. Evolução da concentração média dos AOV's e da razão AOV_T/Alcalinidade no efluente de saída no final da fase de alimentação (alim) e no final dos ciclos de operação dos reatores UASB intermitentes (A e B) e no reactor contínuo (C) ao longo das cargas aplicadas (Legenda: ■ ácido acético; ■ ácido propiónico; ■ ácido iso-butírico; ■ ácido n-butírico; ■ ácido iso-valérico; ■ n-valérico; ■ ácido capróico; — A/A).

Em termos médios, e considerando apenas os valores do final dos ciclos (global), o total de AOV's presente no efluente de saída dos reactores em estudo ultrapassaram as 100 mg Ac.L⁻¹ apenas na última carga aplicada (Figura 20). Na carga I não houve AOV's no efluente de saída dos reactores intermitentes e isto significa que quaisquer AOV's que tenham sido produzidos durante esta carga foram rapidamente convertidos a biogás.

A concentração média do total de AOV's aumentou nos reactores A e C até à carga III. Esse aumento ocorreu entre 0 e 4,51 mg Ac.L⁻¹, na carga I, até 18,9 e 7,9 mg Ac.L⁻¹, na carga III, respectivamente. No reactor B, aumentou até à carga IV, entre 0, na carga I, até 10,7 mg Ac.L⁻¹, na carga IV (ver Tabelas 13, 14 e 15). Na passagem para a carga IV, o total de AOV's diminuiu no reactor A (para 6,6 mg Ac.L⁻¹) e manteve-se semelhante no reactor C (7,7 mg Ac.L⁻¹). Na carga VI, a concentração média do total de AOV's diminuiu nos reactores intermitentes (para cerca de 9 mg Ac.L⁻¹), continuando a diminuir no reactor A, e aumentou no reactor contínuo (para 11 mg Ac.L⁻¹). Estas concentrações são, no entanto, bastante baixas, podendo-se dizer que foi semelhante em todos os reactores estudados, excepto na carga III, quando o reactor A apresentou valores mais elevados. A partir da carga V, a concentração de AOV's aumentou em todos os reactores. Esse aumento ocorreu na ordem dos 40% para a carga VI e dos 20% para a carga VII. O valor médio final foi de 112,8; 125,4 e 114,1 mg Ac.L⁻¹ para os reactores A, B e C, respectivamente (ver Tabelas 13, 14 e 15).

Relativamente ao total de AOV's, é ainda possível observar a partir da Figura 20, que houve uma tendência de acumulação preferencial de AOV's no final da fase de alimentação dos reactores intermitentes em todas as cargas aplicadas, com excepção da carga I em que não foram acumulados AOV's, e com excepção das cargas III (para ambos) e IV (para o reactor A) em que se verificou um aumento no final do ciclo. Isto significa que, de uma forma geral, a fase de estabilização removeu parte dos AOV's acumulados durante a fase de alimentação. No entanto, como também é possível observar a partir da Figura 20, os perfis de AOV's, em termos médios, modificaram-se. A modificação do perfil de AOV's entre a fase de alimentação e o final dos ciclos implica que os AOVs presentes no efluente do final da alimentação influenciam o perfil de degradação destes mesmos AOV's durante a fase de estabilização. A título de exemplo, consideremos o perfil de AOV's obtido para a carga VII no reactor A. Enquanto que, na fase de alimentação, a proporção entre o ácido acético e propiónico foi cerca de 10:7, na fase de estabilização foi cerca de 10:3. Esta análise, é no entanto, mais fiável quando realizado ciclo a ciclo devido aos elevados desvios-padrão que caracterizam as médias obtidas para cada carga (ver Tabelas 13, 14 e 15).

Os perfis médios de AOV's obtidos no final dos ciclos (global) dos reactores intermitentes e no reactor contínuo, para cada carga, foi diferente entre os reactores e entre as cargas estudadas (Figura 20). De seguida destaca-se a presença de cada ácido para cada reactor ao longo das cargas investigadas (ver Tabelas 13, 14 e 15). O ácido acético apareceu no efluente dos reactores intermitentes nas cargas IV, VI e VII, e no efluente do reactor contínuo nas cargas VI e VII. Quando apareceu, foi o AOV maioritário, com excepção apenas da carga VI no reactor A,

quando a concentração de ácido n-valérico superou a do acético. O ácido propiónico apareceu nas cargas VI e VII em todos os reactores em estudo. No entanto, apenas foi o AOV maioritário quando também apareceu nas cargas II e V, no reactor A, embora a baixa concentração média ($3,7 \text{ mg Ac.L}^{-1}$). O ácido iso-butírico nunca foi detectado no efluente de saída ao longo do estudo, com excepção apenas do final da fase de alimentação do reactor A num dos ciclos da carga VI (Figura 20). O ácido n-butírico apresentou sempre concentrações médias baixas no efluente de saída ($<2,7 \text{ mg Ac.L}^{-1}$), mesmo na última carga, quando a quantidade de AOV's total aumentou acima de 100 mg Ac.L^{-1} . Apareceu praticamente em todas as cargas no reactor contínuo, com excepção das cargas I e VI. No reactor A, representou cerca de 80% do efluente de saída na fase de alimentação, na carga II. O ácido iso-valérico também apresentou sempre concentrações médias baixas no efluente de saída ($<6 \text{ mg Ac.L}^{-1}$). O valor médio mais elevado ($7,4 \text{ mg Ac.L}^{-1}$), foi, no entanto, observado no efluente de saída da fase de alimentação do reactor B, na carga VII. O ácido n-valérico foi detectado praticamente em todas as cargas e em todos os reactores, com excepção das cargas I e IV nos reactores intermitentes. Foi o AOV maioritário na carga I, no reactor C ($4,5 \text{ mg Ac.L}^{-1}$), quando foi o único AOV detectado; na carga III, nos reactores A ($8,4 \text{ mg Ac.L}^{-1}$) e C ($3,3 \text{ mg Ac.L}^{-1}$); e na carga VI, no reactor A ($10,9 \text{ mg Ac.L}^{-1}$). Nas cargas II, V e VII do reactor B, este ácido apareceu em igual proporção com os ácidos n-butírico, iso-valérico e caprónico, respectivamente em cada carga. O ácido caprónico foi o AOV maioritário nas cargas II ($2,8 \text{ mg Ac.L}^{-1}$), IV ($3,7 \text{ mg Ac.L}^{-1}$) e V ($5,1 \text{ mg Ac.L}^{-1}$) do reactor C, e na carga III ($3,2 \text{ mg Ac.L}^{-1}$) do reactor B. Em termos médios, nunca foi o AOV maioritário no reactor A. O valor médio máximo observado para este ácido ocorreu na carga V do reactor C. Neste reactor, o ácido caprónico esteve presente em todas as cargas, com excepção das cargas I e VI, tal como o ácido n-butírico.

Em termos médios, e no final dos ciclos (global) dos reactores intermitentes, a razão entre o total de AOV's e a alcalinidade (A/A) foi sempre bastante baixa ao longo das cargas e dos reactores em estudo ($<0,1$). Nos reactores intermitentes, o valor máximo observado ocorreu na carga VII quando atingiu o valor de 0,04. No reactor contínuo, dado que apresentou sempre valores de alcalinidade inferiores aos reactores intermitentes, seria de esperar valores de A/A mais elevados. De facto, a razão A/A neste reactor aumentou a partir da carga VI, apresentando o seu valor médio mais elevado na carga VII (0,08). A diferença entre a razão A/A obtida para a fase de alimentação e o final dos ciclos, nos reactores intermitentes, é evidente. A razão A/A foi sempre superior na fase de alimentação devido ao aumento da concentração de AOV's que caracteriza essa fase. Nas últimas cargas, essa diferença também se justifica com o aumento da alcalinidade no efluente devido à fase de estabilização (Figura 20).

5.1.5 TABELAS-RESUMO

O resumo dos resultados obtidos durante a Fase 2 do plano experimental, referente a este sub-capítulo dos resultados apresenta-se nas Tabelas 13, 14 e 15.

A consideração da CQO_s no efluente de saída foi tida em conta no parâmetro de eficiência de remoção, e por isso, apenas é apresentada, em termos médios, nesta secção. A CQO_T no efluente de saída, foi um parâmetro monitorizado que também não foi apresentado anteriormente. Nesta dissertação, optou-se por explorar em pormenor outros parâmetros e que, devido à extensão que estes ocuparam no capítulo dos Resultados, apenas se apresenta como característica dos efluentes produzidos pelos reactores em estudo, para as cargas operadas.

É preciso ter em conta que, apesar da $CQOs$ no efluente do reactor contínuo (C) ser geralmente inferior à obtida para os reactores intermitentes, o cálculo da eficiência de remoção baseia-se também na CQO de entrada que é o dobro nos reactores intermitentes.

Tabela 13. Resumo dos resultados obtidos durante a Fase 2 do plano experimental para o reactor intermitente A.

Parâmetro	Unidade	Carga						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
Bv	gCQO _T .L ⁻¹ .dia ⁻¹	0,94 (0,05)	1,86 (0,30)	2,74 (0,07)	4,34 (0,18)	6,08 (0,16)	7,38 (0,56)	11,68 (0,64)
V de metano	L CH ₄ .ciclo ⁻¹	6,55 (1,01)	12,04 (2,00)	18,92 (1,59)	35,95 (3,09)	44,95 (2,71)	53,19 (2,77)	76,94 (4,78)
Metano no biogás	%	86,51 (2,63)	85,60 (3,25)	82,21 (0,82)	77,98 (2,65)	76,22 (1,98)	73,69 (2,16)	68,87 (1,91)
Eficiência de remoção	%	96,20 (0,72)	98,39 (0,99)	98,03 (0,69)	98,29 (0,62)	98,85 (0,17)	98,25 (0,44)	97,40 (0,91)
Eficiência de metanização	%	70,05 (6,70)	69,73 (7,03)	74,60 (4,43)	88,27 (6,23)	78,98 (4,9)	77,82 (8,06)	71,54 (5,28)
Produtividade em metano	L CH ₄ .gCQOr ⁻¹	0,30 (0,03)	0,28 (0,03)	0,29 (0,02)	0,35 (0,02)	0,31 (0,02)	0,31 (0,03)	0,28 (0,02)
CQO _T	g.L ⁻¹	0,407 (0,19)	0,299 (0,24)	0,302 (0,04)	0,439 (0,24)	0,594 (0,20)	0,516 (0,08)	1,04 (0,56)
CQO _s	g.L ⁻¹	0,037 (0,01)	0,029 (0,02)	0,053 (0,02)	0,075 (0,03)	0,069 (0,01)	0,130 (0,03)	0,290 (0,11)
pH	-	8,49 (0,18)	8,38 (0,14)	8,14 (0,02)	8,11 (0,07)	8,04 (0,07)	7,93 (0,07)	7,99 (0,10)
Alcalinidade	g CaCO ₃ .L ⁻¹	1,95 (0,33)	2,18 (0,46)	2,20 (0,00)	2,41 (0,26)	2,56 (0,20)	2,58 (0,15)	2,79 (0,11)
AOV _T	mg Ac.L ⁻¹	0,00 (0,00)	10,86 (25,0)	18,88 (21,2)	6,63 (18,7)	8,90 (15,2)	25,77 (33,6)	112,79 (77,6)
Ácido acético	mg Ac.L ⁻¹	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,31 (15,01)	0,00 (0,00)	7,22 (15,3)	85,92 (42,6)
Ácido propiónico		0,00 (0,00)	3,73 (9,87)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,74 (9,90)	3,36 (10,6)	26,42 (48,0)
Ácido iso-butírico		0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ácido n-butírico		0,00 (0,00)	2,71 (4,64)	0,00 (0,00)	1,33 (3,76)	0,00 (0,00)	1,85 (5,84)	0,00 (0,00)
Ácido iso-valérico		0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,02 (10,4)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,42 (7,65)	0,00 (0,00)
Ácido n-valérico		0,00 (0,00)	1,25 (3,30)	8,37 (2,96)	0,00 (0,00)	3,22 (6,30)	10,93 (9,76)	0,45 (1,50)
Ácido capríco		0,00 (0,00)	3,17 (8,39)	4,48 (7,76)	0,00 (0,00)	1,94 (5,13)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

(-), desvios-padrão

Tabela 14. Resumo dos resultados obtidos durante a Fase 2 do plano experimental para o reactor intermitente B.

Parâmetro	Unidade	Carga						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
Bv	gCQO _T .L ⁻¹ .dia ⁻¹	0,99 (0,02)	1,83 (0,20)	2,68 (0,07)	4,33 (0,13)	6,01 (0,20)	7,55 (0,63)	11,52 (0,67)
V de metano	L CH ₄ .ciclo ⁻¹	5,21 (0,65)	10,17 (1,12)	16,75 (1,38)	31,84 (3,17)	44,08 (2,73)	60,21 (3,65)	80,56 (5,53)
Metano no biogás	%	87,46 (3,65)	86,52 (2,53)	82,92 (0,96)	77,69 (1,42)	77,88 (1,32)	77,56 (2,23)	72,81 (2,62)
Eficiência de remoção	%	97,89 (1,84)	98,56 (0,30)	99,14 (0,60)	98,59 (0,45)	98,93 (0,33)	98,34 (0,30)	97,61 (1,31)
Eficiência de metanização	%	56,88 (7,14)	59,56 (2,99)	65,59 (5,46)	79,41 (8,84)	78,19 (4,43)	85,78 (2,76)	75,73 (5,15)
Produtividade em metano	L CH ₄ .gCQOr ⁻¹	0,22 (0,03)	0,24 (0,01)	0,26 (0,02)	0,31 (0,03)	0,31 (0,02)	0,34 (0,01)	0,30 (0,02)
CQO _T	g.L ⁻¹	0,220 (0,09)	0,238 (0,17)	0,118 (0,04)	0,795 (0,76)	0,296 (0,08)	0,553 (0,21)	0,975 (0,45)
CQO _s	g.L ⁻¹	0,021 (0,02)	0,027 (0,01)	0,023 (0,02)	0,062 (0,02)	0,064 (0,02)	0,115 (0,02)	0,277 (0,16)
pH	-	8,56 (0,10)	8,46 (0,12)	8,26 (0,02)	8,20 (0,11)	8,11 (0,07)	8,07 (0,10)	8,17 (0,13)
Alcalinidade	g CaCO ₃ .L ⁻¹	1,87 (0,31)	2,21 (0,58)	2,15 (0,05)	2,24 (0,20)	2,41 (0,23)	2,84 (0,36)	2,86 (0,26)
AOV _T	mg Ac.L ⁻¹	0,00 (0,00)	2,98 (4,10)	7,19 (7,58)	2136 (30,2)	9,03 (17,3)	22,43 (30,9)	125,40 (106,6)
Ácido acético	mg Ac.L ⁻¹	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,22 (23,3)	0,00 (0,00)	9,50 (20,2)	77,24 (37,8)
Ácido propiónico		0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,16 (13,2)	42,67 (72,5)
Ácido iso-butírico		0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ácido n-butírico		0,00 (0,00)	1,49 (3,93)	0,00 (0,00)	2,46 (6,96)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,66 (5,94)
Ácido iso-valérico		0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,86 (3,23)	0,00 (0,00)	3,22 (8,53)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ácido n-valérico		0,00 (0,00)	1,50 (2,56)	2,15 (3,73)	0,00 (0,00)	3,24 (8,57)	8,77 (8,28)	1,42 (3,27)
Ácido capróico		0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,17 (5,49)	0,00 (0,00)	2,57 (6,80)	0,00 (0,00)	1,41 (4,69)

(-) desvios-padrão

Tabela 15. Resumo dos resultados obtidos durante a Fase 2 do plano experimental para o reactor contínuo (C).

Parâmetro	Unidade	Carga						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
Bv	gCQO _T .L ⁻¹ .dia ⁻¹	0,99 (0,10)	1,79 (0,16)	2,69 (0,06)	4,27 (0,09)	5,86 (0,12)	7,16 (0,52)	11,23 (0,68)
V de metano	L CH ₄ .ciclo ⁻¹	2,48 (0,49)	8,86 (0,96)	18,09 (0,47)	32,29 (2,12)	40,36 (1,14)	47,84 (3,73)	70,51 (4,31)
Metano no biogás	%	88,55 (4,05)	84,78 (1,81)	78,37 (0,95)	73,81 (2,59)	76,12 (1,27)	74,73 (1,61)	72,87 (1,29)
Eficiência de remoção	%	98,60 (1,61)	98,91 (0,85)	98,89 (0,32)	98,29 (0,55)	98,90 (0,42)	96,21 (0,77)	95,61 (0,87)
Eficiência de metanização	%	36,35 (10,1)	47,52 (18,1)	70,60 (3,79)	81,28 (5,56)	73,50 (3,40)	73,35 (4,78)	70,25 (6,12)
Produtividade em metano	L CH ₄ .gCQOr ⁻¹	0,11 (0,03)	0,21 (0,03)	0,28 (0,02)	0,32 (0,02)	0,29 (0,01)	0,29 (0,02)	0,28 (0,02)
CQO _T	g.L ⁻¹	0,084 (0,00)	0,055 (0,04)	0,069 (0,03)	0,081 (0,08)	0,069 (0,01)	0,560 (0,18)	0,910 (0,36)
CQO _s	g.L ⁻¹	0,007 (0,01)	0,010 (0,01)	0,015 (0,00)	0,040 (0,01)	0,031 (0,01)	0,150 (0,07)	0,240 (0,05)
pH	-	8,15 (0,05)	8,11 (0,08)	7,84 (0,09)	7,91 (0,04)	7,85 (0,11)	7,71 (0,08)	7,79 (0,12)
Alcalinidade	g CaCO ₃ .L ⁻¹	0,93 (0,40)	1,12 (0,08)	1,02 (0,10)	1,11 (0,20)	1,35 (0,18)	1,32 (0,21)	1,38 (0,23)
AOV _T	mg Ac.L ⁻¹	4,52 (4,76)	4,88 (11,8)	7,92 (7,78)	7,65 (9,78)	11,06 (3,83)	26,60 (38,5)	114,08 (42,3)
Ácido acético	mg Ac.L ⁻¹	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	11,69 (25,0)	72,76 (18,7)
Ácido propiónico		0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,17 (15,3)	31,87 (40,4)
Ácido iso-butírico		0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ácido n-butírico		0,00 (0,00)	0,64 (1,70)	1,17 (2,03)	0,72 (2,05)	2,21(5,84)	0,00 (0,00)	2,68 (5,02)
Ácido iso-valérico		0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,90 (1,79)	1,92 (5,44)	2,71 (4,74)	0,00 (0,00)	2,43 (4,18)
Ácido n-valérico		4,52 (4,76)	1,44 (2,83)	3,28 (2,89)	1,26 (3,57)	1,07 (2,82)	7,74 (8,16)	2,78 (3,79)
Ácido capróico		0,00 (0,00)	2,79 (7,39)	1,56 (1,51)	3,74 (5,27)	5,07 (7,17)	0,00 (0,00)	1,57 (5,20)

(-), desvios-padrão

5.2 OPERAÇÃO DOS REACTORES UASB EM ESTADO ESTACIONÁRIO

A caracterização dos parâmetros de operação dos reactores em estado estacionário por cerca de dois anos a uma Bv de $12 \text{ g CQO}_T \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, foi realizada durante cinco ciclos, e por isso, não se apresentam valores obtidos ao longo dos ciclos operados, mas antes se apresentam os valores médios obtidos durante esses ciclos. Os reactores caracterizados foram nomeados por A', B' e C', referindo-se os reactores A' e B' aos reactores intermitentes, e o reactor C' ao reactor contínuo, em estado estacionário. Respectivamente, foram comparados com os reactores A, B e C, na carga VII aplicada no arranque (Fase 2 do estudo). Assume-se que as diferenças entre os reactores intermitentes se mantêm devido à questão física da sua transparência.

A produção média de metano obtida por ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A' e B') e para o equivalente no reactor contínuo (C') apresenta-se na Figura 21.

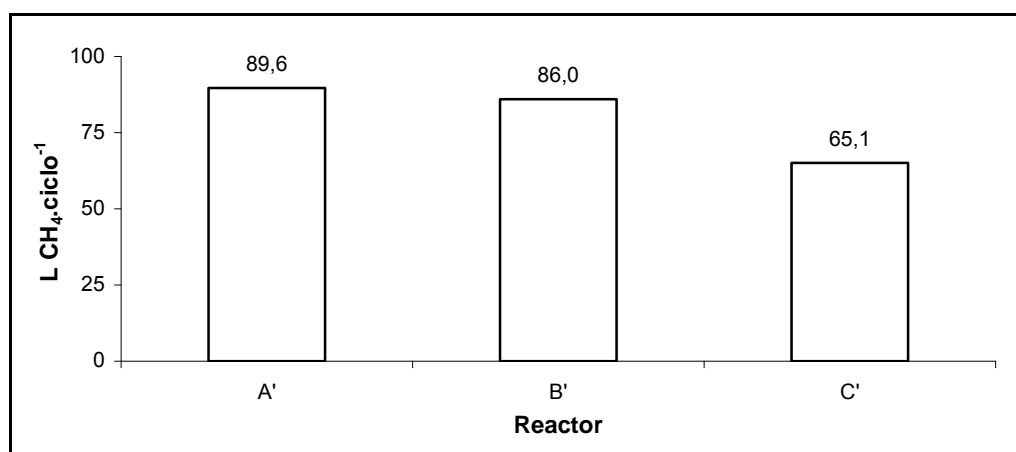


Figura 21. Produção média de metano por ciclo de operação dos reactores UASB intermitentes (A' e B') e contínuo (C') em estado estacionário a uma Bv de $12 \text{ g CQO}_T \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$.

As diferenças na produção de metano por ciclo entre os reactores intermitentes e o reactor contínuo são claras. Os reactores A' e B' produziram mais cerca de 25 e 21 L CH₄.ciclo⁻¹ comparativamente ao reactor contínuo, respectivamente (Figura 21). Isto equivale, respectivamente, a uma superioridade de 27 e 24% na produção de metano. Comparativamente com os valores obtidos durante o arranque dos reactores com lamas novas, a diferença também é clara. À mesma Bv de $12 \text{ gCQO}_T \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, os reactores A e B produziram, em média, 76,9 e 80,6 L CH₄.ciclo⁻¹, e o reactor C produziu, em média, 70,5 L CH₄.ciclo⁻¹ (ver Tabelas 13, 14 e 15). Ou seja, no arranque, os reactores A, B e C produziram, em média, menos 12,7; 5,4 e 5,1 L CH₄.ciclo⁻¹, do que em estado estacionário. É interessante verificar que as diferenças nos reactores B e C são semelhantes, e que, no estado estacionário, as diferenças entre os reactores intermitentes não foi tão elevada como no arranque.

Na Figura 22 apresenta-se a % média e a produção média de metano para cada dia de

ciclo dos reactores UASB intermitentes (A' e B') e para o reactor contínuo (C').

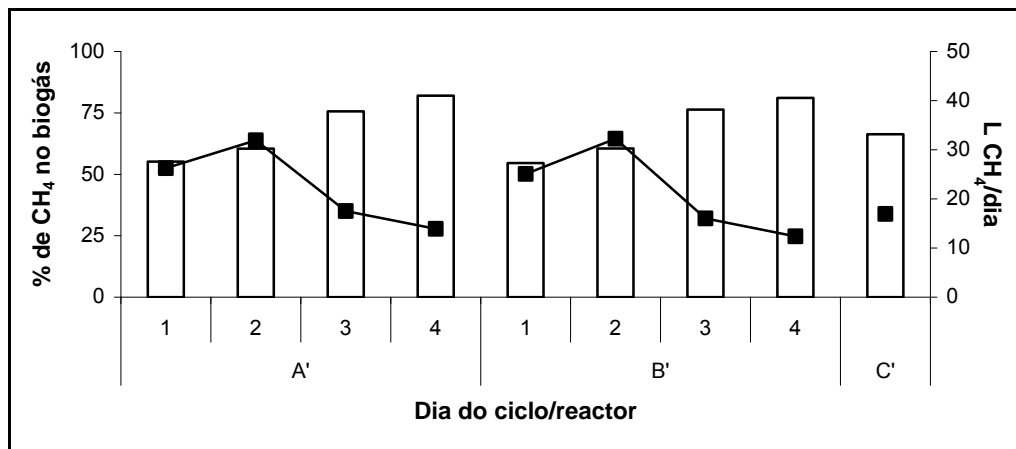


Figura 22. Evolução da percentagem média de metano no biogás e da produção média de metano para cada dia de ciclo dos reactores intermitentes (A' e B') e para o reactor contínuo (C') em estado estacionário a uma Bv de 12 g CQO₇.L⁻¹.dia⁻¹ (Legenda: % de metano no biogás; produção diária de metano).

Tal como foi observado anteriormente, o biogás foi-se tornando cada vez mais rico em metano ao longo dos dias que compõem o ciclo dos reactores intermitentes. Iniciou-se, no dia 1, com uma % de cerca de 55% e terminou, no dia 4, com uma % de cerca de 82 e 81%, nos reactores A' e B', respectivamente (Figura 22). Durante o arranque, a % média de metano no dia 1 do ciclo foi cerca de 57 e 58% e terminou, no dia 4, com uma percentagem de cerca de 75 e 83% nos reactores A e B, respectivamente (Figura 12). A diferença na % de metano entre os dias que compõem os ciclos dos reactores intermitentes também foi diferente para o estado estacionário e para o arranque. Enquanto que, no arranque, a maior diferença verificou-se entre os dias 1 e 2 dos ciclos (A-14 e B-12%), no estado estacionário a maior diferença ocorreu entre os dias 2 e 3 dos ciclos (cerca de 15%) (Figuras 12 e 22). Em termos médios, a % de metano no biogás nos reactores A' e B' foi cerca de 68% e no reactor C' cerca de 65%. No arranque, verificaram-se percentagens de metano médias mais elevadas em todos os reactores (ver Tabelas 13, 14 e 15).

Tal como se observou no arranque, a produção média de metano ao longo dos dias que compõem o ciclo dos reactores intermitentes em estado estacionário também aumentou na fase de alimentação (dias 1 e 2) e diminuiu na fase de estabilização (dias 3 e 4) (Figura 22). No entanto, no estado estacionário, a produção de metano durante a fase de estabilização foi superior à observada no arranque, à mesma carga. Enquanto que os reactores A' e B' produziram cerca de 30 L CH₄ na fase de estabilização, os reactores A e B produziram apenas cerca de 15 e 17 L CH₄, respectivamente (Figuras 12 e 22).

A eficiência média de remoção e metanização para a fase de alimentação (alim) e para os ciclos (global) de operação dos reactores UASB intermitentes (A' e B') e contínuo (C') apresenta-se na Figura 23.

Considerando apenas os valores referentes ao global dos ciclos, a eficiência de remoção

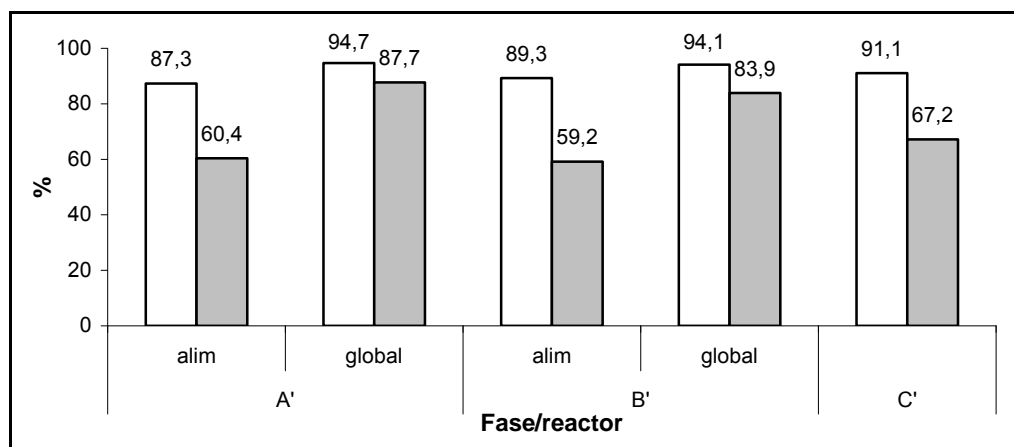


Figura 23. Eficiência média de remoção e metanização para a fase de alimentação (alim) e o global dos ciclos de operação dos reactores UASB intermitentes (A' e B') e para o reactor contínuo (C') em estado estacionário a uma Bv de 12 g CQO_T.L⁻¹.dia⁻¹ (Legenda: □ eficiência de remoção; ■ eficiência de metanização).

nos reactores intermitentes foi cerca de 95 e 94% nos reactores intermitentes, A' e B' respectivamente, e cerca de 91% no reactor contínuo. Assim, os reactores intermitentes removeram mais cerca de 3-4% da CQO presente na alimentação comparativamente com o reactor contínuo (Figura 23). Na carga VII do arranque, todos os reactores apresentaram eficiências de remoção superiores (A-97, B-98 e C-96%). No entanto, a diferença entre a eficiência de remoção nos reactores intermitentes e contínuo foi ligeiramente inferior (apenas cerca de 2%) (Tabelas 13, 14 e 15). Quanto à eficiência de metanização, e considerando o global dos ciclos, observou-se valores de cerca de 88 e 84% nos reactores intermitentes, A' e B' respectivamente, e cerca de 67% no reactor contínuo (Figura 23). Assim, os reactores intermitentes converteram mais cerca de 21 e 17% da CQO removida do que o reactor contínuo. Comparativamente com a carga VII do arranque, estas eficiências de metanização são superiores no caso dos reactores intermitentes, com diferenças de cerca de 16 e 8% dos reactores A e B respectivamente, e inferior no caso do contínuo, com uma diferença de cerca de 3% (Tabelas 13, 14 e 15).

Considerando os valores obtidos para a fase de alimentação e o global dos ciclos, verifica-se que a fase de alimentação foi responsável pela remoção de cerca de 87 e 89% da CQO fornecida, e que a fase de estabilização contribuiu para a remoção de apenas 7,4 e 4,8% da CQO fornecida, nos reactores A' e B', respectivamente (Figura 23). Durante o arranque, observou-se um diferente cenário, pois os reactores também apresentaram eficiências de remoção superiores. No arranque, a fase de alimentação foi responsável pela remoção de cerca de 94 e 95%, enquanto que a fase de estabilização contribuiu apenas para a remoção de 3,4 e 2,4% da CQO fornecida (Figura 15). Quanto à eficiência de metanização, no estado estacionário, observou-se que a fase de estabilização contribuiu com cerca de 27 e 25% da eficiência de metanização global, nos reactores A' e B' respectivamente, enquanto que no arranque apenas contribuiu para cerca de 12 e 14% da eficiência de metanização global, nos reactores A e B, respectivamente. Estes últimos

valores eram de esperar, uma vez que a produção de metano na fase de estabilização em estado estacionário também foi superior à observada no arranque.

Calculando as diferenças entre a eficiência de remoção e de metanização na fase de alimentação e no global do ciclo, verifica-se que, os reactores em estado estacionário converteram a metano cerca de 20% da CQO que foi removida na fase de estabilização (Figura 23). No arranque, esse valor foi de apenas 8,5 e 12%, nos reactores A e B respectivamente.

Pode-se resumir que, e apesar das lamas iniciais terem sido diferentes, bem como, possivelmente também o plano experimental de arranque, ao longo do tempo a produção de metano nos reactores intermitentes aumentou bastante, sobretudo na fase de estabilização, mais especificamente entre os dias 2 e 3 dos ciclos. A eficiência de remoção global da CQO diminuiu e a eficiência de metanização global aumentou. Neste caso, a fase de estabilização passou a desempenhar um papel mais importante na remoção da CQO, mas também converteu de forma mais eficiente a CQO que foi removida durante a fase de alimentação.

A concentração e o perfil médios de AOV's no final da fase de alimentação (alim) e no final dos ciclos de operação dos reactores UASB intermitentes (A' e B') e contínuo (C') apresenta-se na Figura 24.

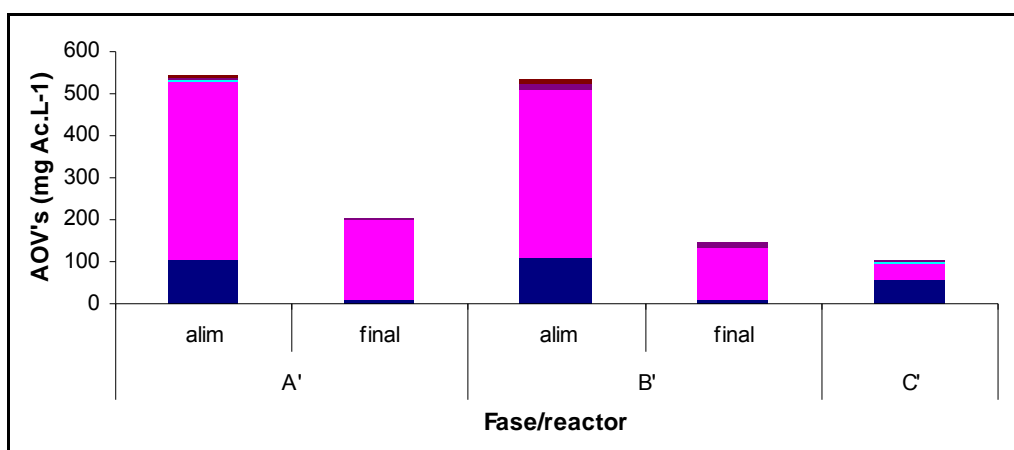


Figura 24. Concentração média dos AOV's no efluente de saída para a fase de alimentação (alim) e o final dos ciclos de operação dos reactores UASB intermitentes (A' e B') e para o reactor contínuo (C') em estado estacionário a 12 g CQO.L⁻¹.dia⁻¹ (Legenda: ■ ácido acético; ■ ácido propiônico; ■ ácido iso-butírico; ■ ácido n-butírico; ■ ácido iso-valérico; ■ n-valérico; ■ ácido capróico; — A/A).

Considerando apenas os valores do final dos ciclos, o total de AOV's foi de 204,9; 146,8 e 106,9 mg Ac.L⁻¹ para os reactores A', B' e C', respectivamente. Ou seja, os reactores intermitentes apresentaram mais cerca de 48 e 27% de AOV's do que o reactor contínuo, nos reactores A' e B' respectivamente (Figura 24, Tabela 16). Comparativamente com o arranque, os valores de AOV_T's nos reactores intermitentes foram superiores no estado estacionário, com as maiores diferenças ao nível do reactor A, enquanto que no contínuo permanecem semelhantes (Tabelas 13, 14 e 15).

Quanto aos perfis médios de AOV's obtidos no estado estacionário, verificou-se que nos reactores intermitentes, o ácido propiônico foi o AOV maioritário com concentrações de 191,4 e

124,1 mg Ac.L⁻¹, equivalentes a cerca de 93 e 85% do total de AOV's nos reactores A' e B', respectivamente. No reactor contínuo, o ácido propiónico representou cerca de 36% dos AOV's presentes no efluente, e o ácido acético foi o AOV maioritário, com uma concentração de 55,2 mg Ac.L⁻¹, representando cerca de 52% do total de AOV's. O ácido acético também foi detectado no efluente dos reactores intermitentes, bem como o ácido iso-valérico, embora a concentrações bastante mais baixas que o propiónico. No efluente do reactor C', além dos ácidos acético e propiónico, outros AOV's como os ácidos iso- e n-butírico e iso-valérico também estiveram presentes, embora também a concentrações bastante mais baixas (Figura 24, Tabela 16). Comparativamente com o arranque, em que o AOV maioritário foi o ácido acético em todos os reactores, distinguem-se desde já os perfis obtidos entre os reactores intermitentes (Tabelas 13, 14 e 15). No caso do reactor contínuo, a proporção de ácido acético no arranque foi cerca de 64% e do propiónico 28% (ver Tabela 15).

Pode-se resumir que, e salvaguardando as questões referidas anteriormente, ao longo do tempo o ácido acético vai sendo substituído pelo propiónico como AOV maioritário nos reactores intermitentes, e que no reactor em modo de operação contínua, a proporção de ácido propiónico no total de AOV's aumenta, embora o ácido acético permaneça como AOV maioritário.

Considerando os valores obtidos para a fase de alimentação e o global dos ciclos, verifica-se que, e tal como foi observado no arranque, houve uma tendência para uma acumulação preferencial de AOV's no final da fase de alimentação (A'-544,6 e B-532,6 mg Ac.L⁻¹), e remoção dos mesmos durante a estabilização. O AOV maioritário foi o propiónico, seguido do ácido acético. Apesar de, durante a fase de estabilização ter sido removido mais ácido propiónico, o ácido acético praticamente desapareceu no final dos ciclos, e por isso, as proporções entre ambos alteraram-se. No reactor A passou de 10 (propiónico):3 (acético), para 100 (propiónico): 3(ácido acético). No reactor B foi semelhante (Figura 24, Tabela 16).

Apesar de, poder parecer à partida, que esta comparação teria mais sentido em estado estacionário, por se assumir que as variações entre ciclos fossem menores, isso não aconteceu. Os desvios-padrão obtidos ocorreram praticamente na mesma ordem de grandeza observada no arranque à mesma carga (Tabelas 13, 14 e 15). A cargas inferiores, no entanto, os desvios apareceram, por vezes, superiores às médias, e por isso, nesse caso teria que se verificar ciclo a ciclo as diferenças entre a fase de alimentação e o final dos ciclos.

Como no arranque, o ácido acético apresentou concentrações superiores tanto na fase de alimentação como no final dos ciclos, não tem comparação directa com o estado estacionário. Pode-se, no entanto, constatar que, como a proporção entre o ácido acético e o propiónico passou de 10(acético):7(propiónico) para 10(acético): 3(propiónico), ou seja, o composto maioritário apareceu em maior proporção no final do ciclo, à semelhança do que se verificou no estado estacionário, embora a menor escala.

O resumo dos resultados obtidos durante a Fase 1 do plano experimental, apresenta-se na Tabela 16.

Tabela 16. Resumo dos resultados obtidos durante a Fase 1 do plano experimental para os reactores intermitentes (A' e B') e contínuo (C').

Parâmetro	Unidade	Reactor		
		A'	B'	C'
Bv	gCQO _T .L ⁻¹ .dia ⁻¹	11,65 (0,60)	11,46 (0,46)	11,49 (0,48)
V de metano	L CH ₄ .ciclo ⁻¹	89,63 (5,12)	85,97 (2,42)	65,05 (5,26)
Metano no biogás	%	68,33 (2,57)	68,15 (1,78)	66,29 (0,85)
Eficiência de remoção	%	94,69 (0,63)	94,12 (0,32)	91,08 (1,13)
Eficiência de metanização	%	87,72 (6,95)	83,91 (2,95)	67,19(3,42)
Produtividade em metano	L CH ₄ .gCQOr ⁻¹	0,34 (0,02)	0,33 (0,01)	0,27 (0,01)
CQO _T	g.L ⁻¹	2,53 (0,41)	2,01 (0,26)	2,09 (0,14)
CQO _s	g.L ⁻¹	0,64 (0,06)	0,71 (0,02)	0,52 (0,05)
AOV _T	mg Ac.L ⁻¹	204,94 (78,9)	146,83 (101,9)	106,94 (70,9)
Ácido acético	mg Ac.L ⁻¹	7,55 (16,9)	7,59 (17,0)	55,16 (16,6)
Ácido propiónico		191,37 (51,0)	124,14 (71,8)	38,08 (52,6)
Ácido iso-butírico		0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,91 (6,52)
Ácido n-butírico		0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,64 (6,38)
Ácido iso-valérico		6,02 (13,5)	15,11 (15,6)	6,15 (9,08)
Ácido n-valérico		0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ácido capróico		0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA

5.3.1 MORFOLOGIA

Os resultados de observação microscópica da biomassa e sobrenadante dos reactores intermitente (B) e contínuo (C) apresentam-se na Figura 25. Observou-se, de uma forma geral, 4 grupos morfológicos de bactérias nas preparações realizadas. Destes, foi possível discriminar sub-grupos consoante o tamanho e a forma das células. A presença destes grupos e sub-grupos na biomassa e sobrenadante dos reactores B e C apresenta-se na Tabela 17 e indicam-se alguns na Figura 25. É de referir que o tamanho das células não foi medido, mas apresentado por comparação entre os tipos morfológicos presentes.

A partir da Figura 25, é possível observar que a composição morfológica da biomassa e sobrenadante de cada reactor são bastante diferentes entre si, bem como também são diferentes no mesmo reactor. Talvez devido à forma como foram feitas as preparações, a quantidade de microrganismos nas preparações do reactor contínuo seja superior do que no intermitente, não tendo sido considerado o volume de amostra para quantificação dos grupos morfológicos tendo

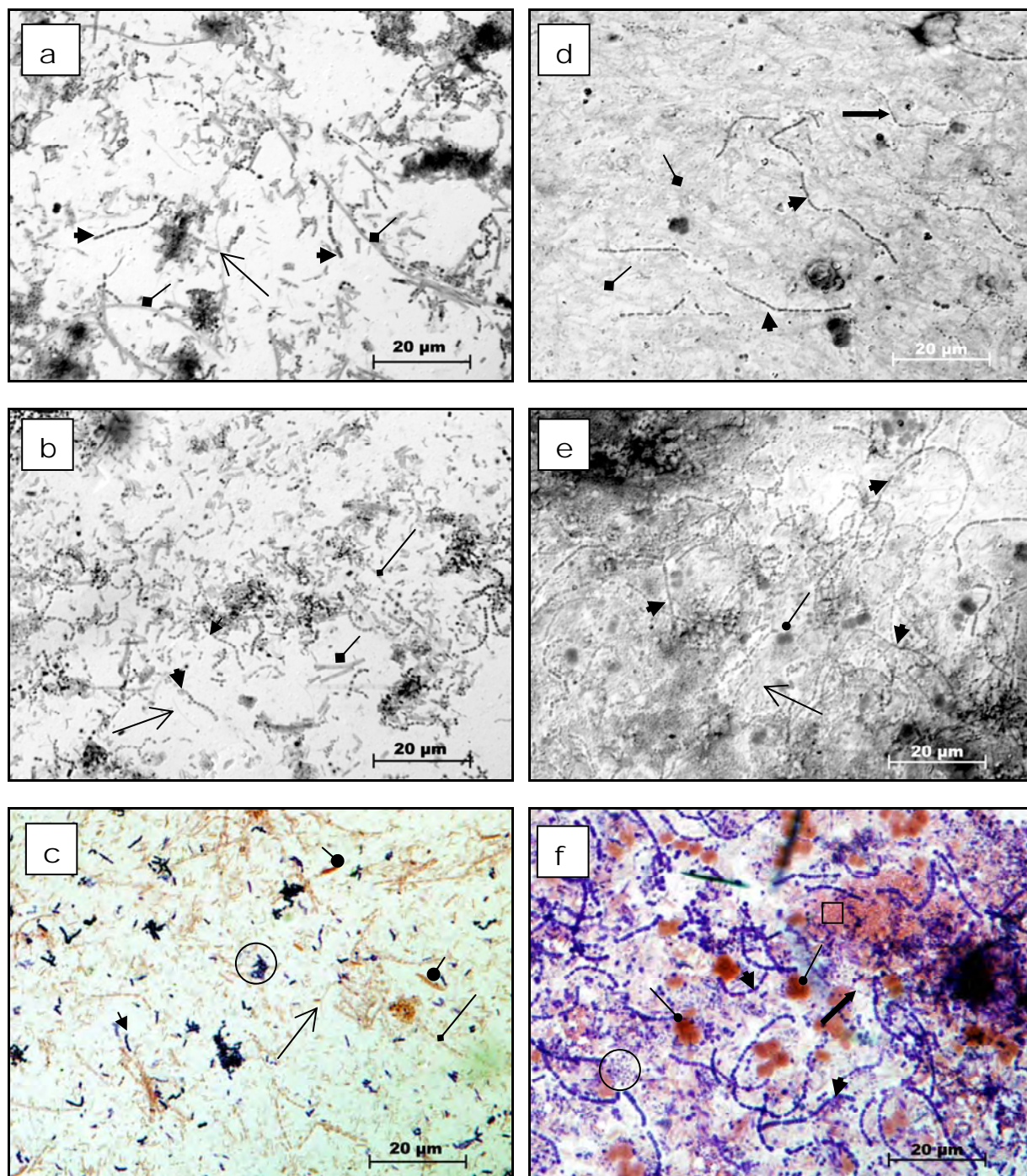


Figura 25. Observação microscópica da biomassa e sobrenadante dos reactores UASB intermitente (B) e contínuo (C) (Legenda: a-c, reactor intermitente (B); d-e, reactor contínuo (C); a-b, biomassa; c-d, sobrenadante; c-f, sobrenadante com coloração de Gram) (● sub-grupo 1; → sub-grupo 2; ◆ sub-grupo 3; —◆ sub-grupo 4; ● sub-grupo 5; —● sub-grupo 6; —○ sub-grupo 7; ○ sub-grupo 8; □ sub-grupo 9).

sido considerado o volume de amostra para quantificação dos grupos morfológicos presentes. É de referir, no entanto, que o sobrenadante do reactor contínuo apresentava uma aparência mais espessa e escura que do reactor intermitente, possivelmente devido à maior quantidade de microrganismos aí presentes, comparativamente com o reactor intermitente.

Tabela 17. Identificação dos grupos morfológicos de bactérias presentes na biomassa e sobrenadante dos reactores intermitente (B') e contínuo (C').

Grupos e sub-grupos morfológicos			Coloração Gram	Reactor B'		Reactor C'	
				B	S	B	S
Cadeias de células (3 ou mais células em cadeia)	Células em forma de coccus	(1) Células largas	Positiva	+	+	+	+
		(2) Células finas	Positiva	-	-	+	+
	Células em forma de bastonete	(3) Células com extremidade direita	Negativa	+	+	+	+
		(4) Células com extremidade arredondada	Negativa	-	+	-	-
Bastonetes (isolados ou aos pares)	Curvos	(5) Grandes	Negativa	-	+	-	+
	Curvos ou direitos	(6) Pequenos	Negativa	+	+	+	+
Filamentosa	Célula em forma de bastonete alongado	(7) Célula fina	Negativa	+	+	+	+
Tipo-sarcina	(8) Parênquima ou pseu-parênquima de células		Negativa	-	+	+	+
Coccus	(9)		Positiva	-	+	-	+

B – Biomassa; S – sobrenadante; (-) – ausente; (+) – presente.

Da Tabela 17, é possível constatar que os grupos e sub-grupos morfológicos presentes na biomassa e sobrenadante de cada reactor são bastante semelhantes, sendo as maiores diferenças verificadas entre os reactores estudados. No entanto, a comparação entre reactores será também realizada com base na Figura 25 onde é possível verificar diferenças ao nível da proporção relativa dos grupos morfológicos presentes nas amostras estudadas.

No reactor B as cadeias de células em forma de coccus e largas (sub-grupo 1) apresentam um comprimento bastante inferior ao do reactor contínuo e nunca são dominantes, ao contrário do que foi possível observar no sobrenadante do reactor C (Figura 25.e e f). A presença de cadeias de células em forma de coccus e finas (sub-grupo 2) apenas foi detectada ao nível do reactor C, embora em pouca quantidade relativamente aos outros sub-grupos presentes. A elevada proporção de cadeias de células em forma de bastonete com extremidade direita (sub-grupo 3) na biomassa do reactor C (Figura 25.d) não foi observada nas amostras do seu sobrenadante (Figura 25.e) nem do reactor B (Figura 25.a, .b e .c), sendo possível afirmar que a matriz de fundo no sobrenadante do reactor C se deveu sobretudo à presença de bastonetes pequenos (sub-grupo 6) e coccus (sub-grupo 9) (Figura 25.f). A presença de cadeias de células em forma de bastonete com extremidade arredondada (sub-grupo 4) apenas foi detectada no sobrenadante do reactor B (Figura 25.b). Os bastonetes curvos e grandes (sub-grupo 5) parecem

ser característicos dos sobrenadantes dos reactores estudados, embora estejam presentes em pequenas proporções relativamente a outros sub-grupos. A classificação dos bastonetes pequenos (sub-grupo 6) foi difícil, primeiro, devido ao seu tamanho o que fez com que pudessem passar despercebidos durante a observação ao microscópio, segundo, porque por vezes apareciam curvos, outras vezes direitos, e terceiro, porque foi necessário definir se assim seriam considerados mesmo que se apresentassem aos pares. Para facilitar essa classificação foram considerados no mesmo grupo. A questão de poderem aparecer aos pares poderá dever-se a mecanismos de fissão binária ou mesmo à formação inicial de cadeias de células do sub-grupo 4. Estes foram detectados em todas as amostras. À semelhança dos bastonetes pequenos, a presença de filamentosas finas (sub-grupo 7) também foi detectada em todas as amostras. Podem apresentar um comprimento variável e ligeiras deformações curvilíneas. Nunca foram abundantes. Os arranjos de células tipo-sarcina (sub-grupo 8) foram detectados em amostras do reactor C, com uma abundância superior no sobrenadante (Figura 25.d, .e e .f) e no sobrenadante do reactor B. Os coccus Gram positivos (sub-grupo 9) parecem ser característicos dos sobrenadantes dos reactores em estudo, à semelhança dos grandes bastonetes. Todavia apareceram de forma mais abundante no sobrenadante do reactor C, comparativamente com o reactor B (Figura 25.c e .f).

5.3.2 ANÁLISE MOLECULAR

O número total de clones detectados por análise molecular no reactor intermitente (B') e contínuo (C') foi semelhante (B'-162 e C'-161 clones). As sequências nucleotídicas dos clones obtidos neste estudo foram comparadas com sequências depositadas numa base de dados genética (GenBank) e estabelecida a % de semelhança entre elas. A distribuição percentual dos clones pelos domínios Arquea e Eubacteria, bem como pelos filos presentes nos reactores intermitente (B') e contínuo (C') apresenta-se na Figura 26.

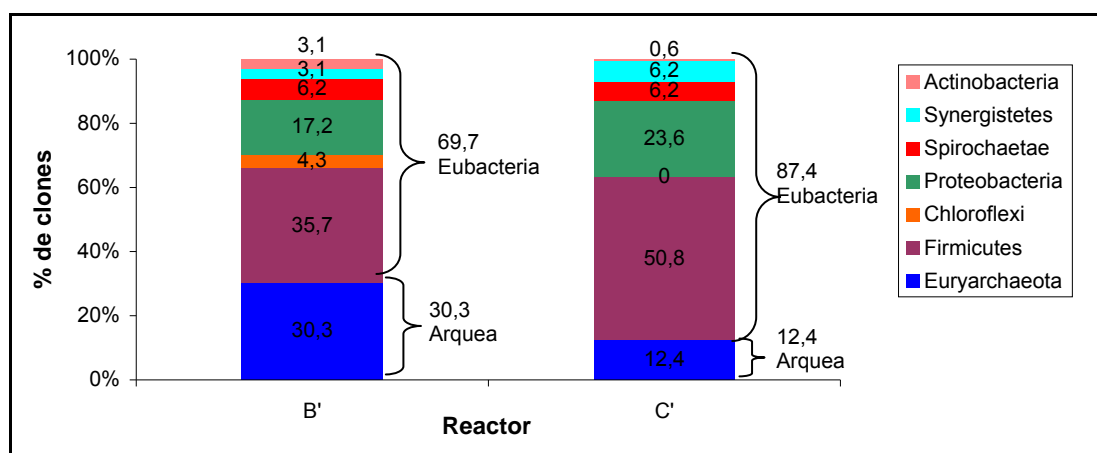


Figura 26. Distribuição percentual dos clones detectados por análise molecular nos filos presentes nos reactores intermitente (B') e contínuo (C').

Da Figura 26, verifica-se que o perfil de distribuição dos clones detectados por análise molecular é diferente entre ambos os reactores, apesar das semelhanças no número total de clones detectados. Relativamente à sua distribuição pelos domínios Arquea e Eubacteria, verifica-se que no reactor B' existe maior diversidade de clones no domínio Arquea (30,3%), enquanto que o reactor C' apresenta apenas 12,4% dos clones nesse domínio. Pelo contrário, o reactor B' apresenta menor diversidade de clones do domínio Eubacteria (69,7%) comparativamente com o reactor C' (87,4%). Relativamente à distribuição dos clones pelos filos, destaca-se, além das diferenças no filo Euryarchaeota (o único filo detectado do domínio Arquea), a menor diversidade de clones afiliados ao filo Firmicutes no reactor B' (35,7,8%), comparativamente com o reactor C' (50,8%). Outras diferenças ocorreram no número de clones afiliados ao filo Chloroflexi, apenas detectados no reactor B' (4,3%), afiliados ao filo Proteobacteria (B'-17,2 e C'-23,3%), afiliados ao filo Synergistetes (B'-3,1 e C'-6,2%) e afiliados ao filo Actinobacteria (B'-3,1 e C'-0,6%). O número de clones afiliados ao filo Spirochaetae foi igual em ambos os reactores (6,2%).

A distribuição percentual dos clones pelos domínios, filos, classes, ordens, famílias e géneros mais próximo, bem como o clone depositado no *Genbank* com o qual foi a semelhança foi estabelecida apresenta-se na Tabela 18.

Com esta análise, os clones foram distribuídos por 21 Unidades Operacionais Taxonómicas (*Operational Taxonomic Units*, OTU's) no reactor B' e 29 no reactor C'. Destas, apenas duas apresentaram semelhança com espécies já cultivadas até à data: a espécie *Syntrophomonas wolfei* subsp. *saponavida* no reactor B' (99% semelhança) e a espécie *Lactococcus lactis* no reactor C' (98% semelhança). Todas as outras OTU's apresentaram semelhança com organismos ainda não cultivados, e a maioria ainda sem publicações associadas.

No domínio Arquea, filo Euryarchaeota, ambos os reactores apresentaram semelhanças (98-99%) com um clone próximo do género *Methanosaeta* (B'-13,6 e C'-9,9% dos clones), da família Methanosaetaceae, e semelhanças (99-100%) com um clone próximo do género *Methanobacterium* (B'-16,7 e C'-2,5% dos clones), da família Methanobacteriaceae. A diferença entre ambos os reactores foi mais evidente para o clone próximo do género *Methanobacterium*.

No filo Firmicutes, foram detectados clones das classes Clostridia (B'-28,3 e C'-37,2% dos clones) e Bacilli (B'-7,4 e C'-13,6% dos clones) em ambos os reactores. Na classe Clostridia, 6,1% dos clones do reactor B' apresentaram semelhanças com clones da família Veillonellaceae, enquanto que no reactor C' foram 9,3%. Destes, o clone Veillonellaceae WK011 foi comum em ambos os reactores (B'-4,9 e C'-3,7% dos clones), com 99% de semelhança. Os outros clones detectados desta família foram próximos do género *Veillonella* (B'-1,2 e C'-5,6% dos clones), com 99% de semelhança, e do género *Anaeromusa* (C'-3%), com 99-100% de semelhança. Na família Clostridiaceae, ambos os reactores apresentaram semelhanças (99-100%) com o clone B9 (B'-7,4 e C'-13,7% dos clones), próximo do género *Clostridium*. Na família Ruminococcaceae, apenas o reactor B' apresentou semelhanças (94%) com o clone S3-3 (6,2%), próximo do género *Anaerofilum*. Na família Syntrophomonadaceae, apenas o reactor B' apresentou semelhança (99%)

Tabela 18. Sequências semelhantes às detectadas nas amostras de biomassa dos reactores intermitente (B') e contínuo (C') e sua distribuição percentual pelo total de clones detectados.

Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Género mais próximo	Sequência mais próxima	Nº de acesso	Reactor B'		Reactor C'	
								S (%)	C (%)	S (%)	C (%)
Arquea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta</i>	UAC D242_ARC_0302_2_071	AB447864.1	99	13,6	98	9,9
		Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	UAC T1_9	EU828446.1	99-100	16,7	99	2,5
Eubacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Veillonellaceae	Veillonellaceae WK011		AB298743.2	99	4,9	99	3,7
					<i>Veillonella</i>	UTFS-R119-79	GQ455715.1	99	1,2	-	-
						UBC 1426	AB286539.1	-	-	99	5
						UBC 1337	AB286503.1	-	-	99	0,6
					<i>Anaeromusa</i>	UB C D242_27F_BAC4_058	AB447756.1	-	-	100	1,2
						UBC D242_27F_BAC_010	AB447693.1	-	-	100	1,2
						UBC D242_27F_BAC2_012	AB447718.1	-	-	99	0,6
				Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	UBC B9	EU234163.1	100	7,4	99	13,7
				Ruminococcaceae	<i>Anaerofilum</i>	UBC S3-3	FJ424348.1	94	6,2	-	-
				Syntrophomonadaceae	<i>Syntrophomonas</i>	<i>S. wolfei</i> subsp. <i>saponavida</i>	DQ666176.1	99	1,2	-	-
						UBC BHB03	AB248632.1	99	6,2	-	-
				Peptococcaceae	<i>Desulfosporosinus</i>	UBC MBF4_36	AB330862.1	92	1,2	92	11,2
		Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	UBC Saki_g05	EU475800.1	98	1,2	98	7,5
						UBC nbw1200g03c1	GQ082142.1	99	6,2		
						UB BB1_d02_3	EU772602.1	-	-	95	3,7
					<i>Lactococcus</i>	UBC UTFS-R119-26	GQ455667.1	-	-	99-100	1,2
						<i>L. lactis</i> , estirpe KLDS4.0602	GQ337894.1	-	-	98	1,2
					UB		CU926801.1	99	4,3	-	-
	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	<i>Levilinea</i>	UB	CU926801.1	99	4,3	-	-
	Proteobacteria	Gamma proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	UBC Bol_b6c		EU996470.1	100	8,6	100	5
					<i>Enterobacter</i>	UBC aab17g12	DQ816420.1	-	-	99	0,6
						DIV158	FN547808.1	-	-	99	1,2
						UB	GQ264458.1	-	-	99	0,6
						UB Enterobacter, clone F5aug.9	GQ416172.1	-	-	99	0,6
					<i>Klebsiella</i>	UB	EU993492.1	-	-	100	11,2
		Delta proteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	UBC 21b07	EF515193.1	99	3,1	-	-
						UBC SR_FBR_E70	AY340829.1	99	4,3	-	-
			Syntrophobacterales	Syntrophaceae	<i>Syntrophus</i>	UBC SWADLP1-27	FJ535512.1	98	1,2	98	4,4
						UBC Turk_h4	EU985338.1	100	3,7	100	3,7
	Spirochaetae	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i>	UB	AB465691.1	100	2,5	100	2,5
	Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	<i>Synergistes</i>	UB	CU925553.1	98	3,1	-	-
					<i>Aminomonas</i>	UB	CU926925.1	-	-	99	4,4
						UB	CU920846.1	-	-	99	1,8
	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	<i>Propionibacterium</i>	UBC 16.8h_Day0_BacA_45	AB447631.1	99	3,1	100	0,6

S – semelhança; C-clones; UB – bactéria ainda não cultivada, UBC – clone de bactérias ainda não cultivada; UiB – bactéria ainda não identificada; UAC – clone de *arqueon* ainda não cultivado

com a espécie *Syntrophomonas wolfei* subsp. *saponavida* (1,2% dos clones) e semelhança (99%) com um clone próximo do género *Syntrophomonas*. Na família Peptococcaeaceae, ambos os reactores apresentaram semelhanças (92%) com o clone MBF4_36 (B'-1,2 e C'-11,2% dos clones), próximo do género *Desulfosporosinus*. Na classe Bacilli, apenas foram detectados clones próximos de clones da família Streptococcaceae. Estes clones foram semelhantes (95-99%) a clones próximos do género *Streptococcus* (B'-7,4 e C'-11,2% dos clones) em ambos os reactores, e semelhantes (98-100%) a um clone próximo do género *Lactococcus* (C'-1,2% dos clones) e à espécie *L. lactis* estirpe KLDS4.0602 (C'-1,2% dos clones) apenas no reactor C'.

Do filo Chloroflexi, apenas o reactor B' apresentou semelhanças (99%) com um clone próximo do género Levilinea, da família Anaerolineaceae, com 4,3% dos clones detectados.

Do filo Proteobacteria, foram detectados clones das classes Gamaproteobacteria (B'-8,6 e C'-19,2% dos clones) e Deltaproteobacteria (B'-8,6 e C'-4,4% dos clones) em ambos os reactores. Na classe Gamaproteobacteria, ambos os reactores apresentaram semelhanças (100%) com um clone da família Enterobacteriaceae (B'-8,6 e C'-5% dos clones), enquanto que os restantes clones semelhantes (99-100%) a clones próximos dos géneros *Enterobacter* (C'-3% dos clones) e *Klebsiella* (C'-11,2% dos clones), dessa família, apenas foram detectados no reactor C'. Na classe Deltaproteobacteria, o reactor B' apresentou clones semelhantes a clones das famílias Desulfovibrionaceae (B'-7,4% dos clones) e Syntrophaceae (B'-1,2% dos clones), enquanto que no reactor C' isso verificou-se apenas para a família Syntrophaceae (C'-4,4% dos clones). Na família Desulfovibrionaceae, os clones do reactor B' foram semelhantes (99%) a clones próximos do género *Desulfovibrio*. Na família Syntrophaceae, os clones apresentaram semelhanças (98%) com um clone próximo do género *Syntrophus*.

Do filo Spirochaetae, além da semelhança na percentagem de clones afiliados a este filo, os clones detectados em ambos os reactores apresentaram a mesma semelhança (100%) a dois clones próximos do género Treponema, da família Spirochaetaceae.

Do filo Synergistetes, o reactor B' apresentou clones semelhantes (98%) a um clone próximo do género *Synergistetes*, da família Synergistaceae, enquanto que o reactor C' apresentou semelhanças (99%) a clones próximos do género *Aminomonas* da mesma família. Finalmente, do filo Actinobacteria, ambos os reactores apresentaram semelhanças (99-100%) com um clone próximo do género Propionobacterium (B'-3,1 e C'-0,6% dos clones), da família Propionibacteriaceae.

6 DISCUSSÃO

6.1 OPERAÇÃO DOS REACTORES UASB

6.1.1 CONDIÇÕES DE ARRANQUE

O arranque dos reactores UASB intermitentes e contínuo, até à carga VII (Bv global de cerca de 12 g CQO.L⁻¹.dia⁻¹), durou cerca de 6,5 meses, inclusivamente. No entanto, por definição, o arranque de reactores UASB termina com o início do processo de granulação (Singh *et al.*, 1998). Neste trabalho, o processo de granulação foi observado no final da carga IV (Bv global de cerca de 4,5 g CQO.L⁻¹.dia⁻¹), e por isso, por definição, durou apenas 2,8 meses. Este é um tempo mais curto do que o aconselhado na literatura para o arranque de reactores UASB (4-8 meses) (Singh *et al.*, 1998). No entanto, os incrementos de carga, posteriores à carga IV, foram realizados de forma mais progressiva (25-33%) do que o permitido após a fase de arranque ou granulação (50-100%) (Henze, 1997). Neste trabalho, designou-se por “arranque” a fase do plano experimental até à carga VII, para comparação com o estado estacionário a essa carga.

Num estudo anterior, o arranque até uma Bv global de cerca de 12,5 g CQO.L⁻¹.dia⁻¹ em reactores UASB intermitente e contínuo, e com a mesma alimentação, durou cerca de 18 meses, inclusivamente, e por isso foi superior ao usado neste trabalho (Nadais *et al.*, 2006). No entanto, noutro estudo semelhante, o arranque até uma Bv global de cerca de 13 g CQO.L⁻¹.dia⁻¹ foi inferior (cerca de 4 meses) (Nadais *et al.*, 2005). Também houve diferenças nas cargas seleccionadas, nomeadamente na carga inicial, que nesses estudos foi de 2,5 g CQO.L⁻¹.dia⁻¹, enquanto que, neste trabalho, foi de 1. g CQO.L⁻¹.dia⁻¹. A carga inicial usada neste trabalho, tendo como base os sólidos inicialmente presentes nos reactores (12,2 g SSV.L⁻¹), equivaleu a uma carga orgânica de cerca de 0,08 g CQO.gSSV⁻¹.dia⁻¹. Este valor está na gama baixa dos valores recomendados para o arranque de reactores UASB (0,07-0,49

g CQO.gSSV⁻¹.dia⁻¹) (Singh *et al.*, 1998), e por isso, a carga inicial, neste trabalho, poderia ter sido mais elevada.

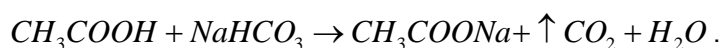
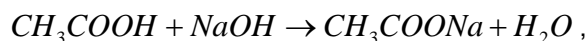
A actividade metanogénica específica (AME) é uma medida da capacidade das lamas anaeróbias em converterem um substrato orgânico a metano (Souto *et al.*, 2009), e reflecte a adaptação das lamas a esse substrato (Sørensen *et al.*, 1991). Nas lamas inicialmente usadas para o arranque dos reactores UASB, a AME foi, por ordem decrescente, 4,5 para a glucose, 4,4 para o leite meio-gordo, 4,3 para o leite magro e 3,9 para o acetato (valores em ml CH₄.h⁻¹.gSSV⁻¹). Estes são valores inferiores aos obtidos para as lamas iniciais no estudo de Nadais *et al.* (2006), sobretudo para o leite magro (17,5 ml CH₄.h⁻¹.gSSV⁻¹) e o leite meio-gordo (11,3 ml CH₄.h⁻¹.gSSV⁻¹). Nesse estudo, as lamas tiveram origem num digestor tratando efluentes de uma fábrica de bebidas à base de leite (Lactogal), enquanto que neste trabalho tiveram origem num digestor tratando efluentes de uma fábrica de queijos (Bell Fromagerie), o que poderá justificar as diferenças na AME. Com este resultado, sugere-se que as lamas usadas para o arranque dos reactores UASB, neste trabalho, estavam menos adaptadas para os substratos comparativamente com as lamas usadas no estudo anterior.

A duração da fase *lag* para a produção de metano com glucose (sem fase *lag*), leite magro e leite meio-gordo (2 horas) foi inferior à obtida no estudo de Nadais *et al.* (2006), enquanto que, com ácido acético foi igual (10 horas). As diferenças na duração da fase *lag* poderão estar relacionadas com o tempo e temperatura de armazenamento das lamas, antes do ensaio (Sommer *et al.*, 2007). O ácido acético é substrato dos microrganismos metanogénicos acetotróficos (Garcia *et al.*, 2000). O facto da duração da fase *lag* para este substrato ter sido de 10 horas, sugere que a actividade dos microrganismos acetotróficos esteve, em ambos os casos, inibida, embora fosse obtida maior AME no estudo anterior (6,9 ml CH₄.h⁻¹.gSSV⁻¹). As espécies dos géneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina* são os únicos microrganismos metanogénicos acetotróficos. O género *Methanosaeta* caracteriza-se por uma baixa taxa de crescimento (μ) e coeficiente de saturação (K_s), enquanto que o género *Methanosarcina* caracteriza-se por um elevado μ e K_s . Em sistemas de digestão anaeróbia convencionais, espécies do género *Methanosaeta* predominam sobre espécies do género *Methanosarcina*, devido aos baixos níveis de acetato presentes (Conklin *et al.*, 2006), e a concentração máxima de acetato para a actividade do género *Methanosaeta* é de 200 mg Ac.L⁻¹ (Gunnerson e Stuckey, 1986). Na determinação da AME usou-se 5 g Ac.L⁻¹, por isso, mediu-se mais exactamente, a actividade do género *Methanosarcina*. Devido à duração da fase *lag* para este substrato, pode-se concluir que foram as espécies do género *Methanosarcina*, presentes nas lamas iniciais, que se encontravam de algum modo inibidas, possivelmente devido aos baixos níveis de acetato nos digestores de onde foram recolhidas.

Relativamente à eficiência de metanização da CQO fornecida no final do ensaio da AME, observou-se que não variou da mesma forma que a AME. Obteve-se eficiências de metanização superiores para os substratos complexos (leite) (leite magro-26,9 e leite meio-gordo-24,9%), seguida do ácido acético (17,6%) e da glucose por último (8,6%). Assim,

apesar da AME para a glucose ter sido a mais elevada (com pouca diferença relativamente aos outros substratos), e não ter apresentado fase *lag*, foi o substrato que apresentou a menor conversão a metano no final do ensaio. Este facto poderá estar relacionado com a acumulação de AOV's decorrentes da sua rápida hidrólise e acidogénese, com consequente descida de pH e inibição da metanogénese (Zeeman *et al.*, 1997; Yu e Fang, 2002). No caso dos substratos complexos, a presença de AGCL's poderá ter inibido, em parte, a acidogénese da glucose (Lalman e Bagley, 2002; Lalman *et al.*, 2004), bem como a presença de NH_3 , produzido durante a acidogénese das proteínas, poderá ter neutralizado a descida de pH decorrente da acidogénese da glucose (Bai *et al.*, 2004). A maior eficiência de metanização com os substratos complexos poderá ser assim justificada pela presença de lípidos e proteínas. Dado que a eficiência de metanização foi superior com o leite magro, comparativamente com o leite meio-gordo, sugere-se que a maior proporção proteínas:lípidos no primeiro caso, seja mais eficaz na metanização da CQO presente no leite. Este resultado não é corroborado pelo estudo de (Vidal *et al.*, 2000). No entanto, os autores compararam eficiências de metanização usando leite magro e leite gordo como substratos.

Relativamente à ausência ou baixa produção de metano nas amostras com ácido acético e neutralizadas até pH 7 com NaOH ou NaHCO_3 , a explicação não é clara. No entanto, poderão estar relacionadas com a formação de acetato de sódio (CH_3COONa) durante as neutralizações, como se exemplifica nas seguintes equações,



Noutros estudos em que foi realizada a determinação da AME usando acetato de sódio como substrato (Luostarinen e Rintala, 2005; Souto *et al.*, 2009), os valores obtidos foram inferiores ao obtido neste estudo, com ácido acético sem neutralização. No entanto, as lamas em questão também eram diferentes. A presença do ião sódio em maior quantidade nas incubações em que foi realizada a neutralização poderá explicar as diferenças. A toxicidade ao ião sódio em sistemas de digestão anaeróbia foi observada com adições de 2-4 g $\text{CH}_3\text{COONa.L}^{-1}$ (McCarty e McKinney, 1961), e por isso, neste estudo, a utilização de 5 g substrato. L^{-1} poderá justificar a ausência de produção de metano nas incubações com neutralização prévia.

6.1.2 DESEMPENHO DURANTE O ARRANQUE

Das cargas I à VII, o volume de metano produzido aumentou linearmente com o aumento de carga, em todos os reactores, com coeficientes de correlação entre 0,96-0,97, o que está de

acordo com as descobertas de Fang e Chui (1993). Por este motivo, a Bv máxima após a qual se verifica a falha dos reactores não foi atingida neste estudo, e por este motivo também, as oscilações observadas na produção de metano nas cargas VI e VII, se podem atribuir às oscilações observadas na Bv efectiva. Segundo Nadais *et al.* (2005), a Bv máxima para os reactores intermitentes é de 22 g CQO.L⁻¹.dia⁻¹.

Os reactores intermitentes produziram mais metano do que o reactor contínuo. O reactor A produziu mais metano do que o reactor C em todas as cargas investigadas, com a menor diferença observada na carga III (4%) e a maior na carga I (62%). O reactor B produziu mais metano do que o reactor contínuo nas cargas iniciais (I-52,5 e II-12,9%) e finais (V-8,5; VI-20,5 e VII-12,5%), e mais metano do que o reactor A apenas nas cargas finais VI (11,7%) e VII (4,5%). Apesar das diferenças nas condições de arranque, referidas anteriormente, o estudo de Nadais *et al.* (2006), obteve, tal como foi observado no reactor B, produções de metano inferiores ao reactor contínuo a Bv's entre 3,3-4,6 g CQO.L⁻¹.dia⁻¹.

As diferenças entre os reactores intermitentes, observadas neste estudo, poderão estar relacionadas com a transparência dos reactores. Sawayama *et al.* (2000) isolaram duas espécies fototróficas (capazes de realizar fotossíntese) de um reactor UASB exposto a iluminação artificial na parte superior e alimentado a uma mistura de acetato, propionato e lactato. Essas espécies foram *Rhodopseudomonas palustris*, estirpe RN1, e *Blastochloris sulfovirdis*, estirpe GN1. A cor da primeira é vermelha acastanhada e a segunda verde azeitona (Imhoff *et al.*, 2002). É interessante verificar que, no reactor B, e apesar de não ter sido utilizado qualquer tipo de iluminação, o material que foi sendo acumulado nas suas paredes internas, ao longo das cargas, apresentava inicialmente cor verde (da carga I à IV) e depois passou a apresentar uma mistura de cores verde e vermelha (da carga V à VII). Estas acumulações seriam provavelmente bactérias semelhantes às isoladas por Sawayama *et al.* (2000).

Em termos médios, a % de metano no biogás foi diminuindo com o aumento de carga, em todos os reactores, o que também está de acordo com o observado por Fang e Chui (1993). Por outro lado, ao longo dos quatro dias que compõem o ciclo dos reactores intermitentes, a % de metano no biogás aumenta, enquanto que a produção volumétrica de metano aumenta durante a fase de alimentação e diminui na fase de estabilização. O facto da % de metano no biogás aumentar entre a fase de alimentação e estabilização poderá estar relacionado com a razão F/M (*food to microorganism ratio*) (Fang e Chui, 1993), e que é diferente em cada fase. De facto, a fase de alimentação foi responsável pela remoção de cerca 95-99% da CQO da alimentação, e por isso, a fase de estabilização caracteriza-se por uma razão F/M bastante inferior à da fase de alimentação. É, no entanto, necessário ter em conta que parte da CQO removida, na primeira fase do ciclo, foi convertida a metano na fase seguinte (cerca de 8,5-12,5% nas cargas VI e VII). Segundo, Nadais *et al.* (2005) a remoção da CQO na fase de alimentação deve-se, em parte, à sua retenção por mecanismos físico-químicos de retenção/adsorção. Nesse estudo, a fase de estabilização foi responsável pela metanização de cerca de 25% da CQO que foi removida na primeira fase, a uma Bv de 10 g CQO.L⁻¹.dia⁻¹. Esse valor equivale ao dobro da metanização

máxima observada para a fase de estabilização neste trabalho, da CQO que foi removida na primeira fase.

A justificação para a diminuição das diferenças na % de metano do biogás entre os dias dos ciclos, a partir da carga V, com excepção da carga VI no reactor B, parece ser, neste caso, o aumento da razão F/M. A excepção observada no reactor B, deveu-se possivelmente, à ocorrência de uma descida apenas ligeira na eficiência de remoção da CQO na fase de alimentação, comparativamente com o reactor A para a mesma carga, e que possibilitou manter as diferenças na % de metano entre os dias dos ciclos. Relativamente às diferenças entre o dia 1 e o dia 2 dos ciclos, e que foi a maior às cargas mais elevadas deste trabalho, a justificação não pode ser a diminuição da razão F/M. Neste caso, a ocorrência de uma degradação superior de lípidos no segundo dia da alimentação, comparativamente com o primeiro, poderia justificar o aumento da % de metano no biogás, devido ao maior rendimento teórico em metano para a digestão anaeróbia destes compostos (Gujer e Zehnder, 1983). Os lípidos poderão ser preferencialmente degradados no segundo dia de alimentação, comparativamente com o primeiro, dado que a sua degradação é função da adsorção dos AGCL à biomassa (Hwu *et al.*, 1998). Assim, o primeiro dia de alimentação reflectiria o processo inicial de hidrólise e adsorção, para os lípidos. Decorrente do fenómeno de adsorção, a proporção de lípidos:açúcares aumentaria no segundo dia, o que pode ter efeitos negativos na degradação preferencial desses açúcares tal como foi discutido para a AME.

Comparativamente com outros estudos, a eficiência de remoção média foi bastante elevada neste trabalho ($\geq 98\%$). As excepções verificaram-se para as cargas mais baixas, nos reactores intermitentes (I e II), quando foi ligeiramente inferior, e para as cargas mais elevadas, no reactor contínuo (VI e VII), quando os reactores intermitentes removeram mais CQO do efluente do que o reactor contínuo (2% superiores). É interessante verificar que, comparativamente com o estudo de Nadais *et al.* (2006), as eficiências de remoção foram sempre mais elevadas neste trabalho, ou semelhante tomando como aproximação a Bv de $12,5 \text{ g CQO.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ operada nesse estudo e carga VII operada neste trabalho.

A eficiência de metanização revelou-se como um parâmetro mais sensível do que a eficiência de remoção e a produção de metano, individualmente, devido às oscilações observadas nos ciclos operados a cada carga. Em termos médios, a eficiência de metanização apresentou as mesmas variações com o aumento de carga do que a produção média de metano e a comparação entre reactores seguiu o mesmo perfil. É de referir que as eficiências médias de metanização mais elevadas foram para os reactores A (88,3%) e C (81,3%), na carga IV, e para o reactor B (85,8%), a carga VI. No estudo de Nadais *et al.* (2006), as eficiências de metanização mais elevadas para os reactores intermitentes (88%) e contínuo (78%) ocorreram à Bv de $2,5 \text{ g CQO.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (semelhante à Bv efectiva observada para a carga III deste trabalho).

A produtividade média em metano mais elevada neste trabalho foi de $0,35 \text{ L CH}_4.\text{gCQO}_r^{-1}$ para o reactor A; $0,34 \text{ L CH}_4.\text{gCQO}_r^{-1}$ para o reactor B e $0,32 \text{ L CH}_4.\text{gCQO}_r^{-1}$ para o reactor C. Estes valores são mais informativos do que para comparação com outros autores, uma vez que as

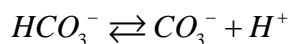
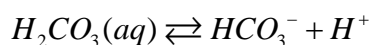
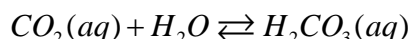
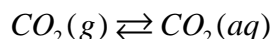
condições de arranque, as lamas iniciais, o volume do reactor, o tipo de reactor e os parâmetros de operação são diferentes. No entanto, pode-se referir que são superiores aos obtidos por Shin e Paik (1990) que usou leite comercial para alimentação de um reactor UASB típico e são semelhantes aos obtidos por Öztürk *et al.* (1993) que usou leite magro na alimentação de um reactor UASBH.

A realização de uma digestão anaeróbia equilibrada depende de valores de pH óptimos para a actividade dos microrganismos metanogénicos, que crescem numa gama estrita de pH entre 6,4-7,5 (Kugelman e Chin, 1971). Segundo Seagren *et al.* (1991), valores de pH superiores a 8,1 inibem a actividade dos microrganismos metanogénicos devido a efeitos ao nível celular, como a actividade enzimática, transporte membranar ou a força-motriz de protões. Neste trabalho, os valores médios de pH no efluente de saída variaram entre 7,93-8,49 no reactor A, entre 8,07-8,56 no reactor B e entre 7,71-8,15 no reactor C. A metanogénese poderá, assim, ter estado inibida no reactor A até à carga IV, no reactor B em todas as cargas, excepto na carga VI, e no reactor contínuo apenas na carga I, devido aos efeitos do pH na metanogénese. É interessante verificar que, na carga VI, quando os valores de pH no reactor B desceram abaixo de 8,1, este reactor apresentou o seu valor máximo de eficiência de metanização, observado ao longo do estudo.

A capacidade tampão dos digestores anaeróbios é proporcional à alcalinidade, e refere-se à resistência a alterações rápidas e significativas de pH no sistema. As alterações na alcalinidade precedem, geralmente, as alterações de pH, e por isso, a alcalinidade é uma medida mais fiável dos desequilíbrios que possam ocorrer na cadeia trófica metanogénica (Ward *et al.*, 2008). Segundo Li e Sutton (1983) e Tchobanoglous *et al.* (2003), a alcalinidade de um digestor anaeróbio deve situar-se entre 2-4 g $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$. Neste trabalho, foram adicionadas 2 g de uma mistura de NaHCO_3 e KHCO_3 (1:1) por litro de alimentação ao reactor contínuo (equivalente a 2,2 g $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$), e o dobro aos reactores intermitentes (equivalente a 4,4 g $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$), para que, no global, a alcalinidade adicionada fosse a mesma.

Os valores médios de alcalinidade no efluente de saída variaram entre 1,95-2,79 no reactor A, entre 1,87-2,86 no reactor B e entre 0,93-1,38 no reactor C. Tal como para o pH, a alcalinidade no efluente de saída dos reactores intermitentes foi superior à do reactor contínuo em todas as cargas investigadas, exceptuando, quando a alcalinidade nos reactores intermitentes apresentou diminuições em alguns ciclos. Além disso, o reactor contínuo apresentou sempre valores de alcalinidade, no efluente de saída, inferiores aos recomendados, apesar da adição de 2,2 g $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ na alimentação. Quando a alcalinidade no efluente de saída é inferior à de entrada de um digestor anaeróbio, significa que ocorreu consumo de alcalinidade (Ramakrishnan e Gupta, 2008). Num digestor, a alcalinidade pode ser consumida em reacções de neutralização de iões H^+ que podem ser libertados durante a dissociação do ácido carbónico (H_2CO_3), presente em solução devido à dissolução do CO_2 gasoso, e durante a dissociação dos AOV's que ocorre de forma completa a pH neutro-alcalino:

- Dissolução do CO_2 (g) e dissociação do H_2CO_3 (Gunnerson e Stuckey, 1986)



- Dissociação dos AOV's (Li e Sutton, 1983)



Por outro lado, os microrganismos metanogénicos produzem alcalinidade, por exemplo, na forma do ião bicarbonato (HCO_3^-) e de amoníaco (NH_3) durante a metanogénese (Appels *et al.*, 2008), e consomem acetato, que se poderia dissociar, baixando o pH (Jedrzejewska-Cicinska *et al.*, 2007). Assim, crê-se que a metanogénese neutralizou a descida de pH provocada pela acido e acetogénese (Jedrzejewska-Cicinska *et al.*, 2007). Dado que, no reactor contínuo, ocorreu consumo de alcalinidade, sugere-se que isso esteja relacionado, sobretudo, com o equilíbrio CO_2 - H_2CO_3 - CO_3^{2-} no reactor, ocorrendo uma deslocação deste equilíbrio no sentido da solubilização do CO_2 e dissociação do H_2CO_3 .

A justificação para os reactores intermitentes apresentarem valores de pH e alcalinidade superiores ao reactor contínuo poderá estar relacionada com a recirculação do efluente durante a fase de estabilização, uma vez que a quantidade de alcalinidade adicionada foi, no global, a mesma. Samsoon *et al.* (1991), estudaram o efeito da recirculação do efluente num reactor UASB tratando sumo de maçã (rico em açúcares) e verificaram que a alcalinidade aumentou com a recirculação do efluente e que a sua adição pôde, assim, ser reduzida. Rincon *et al.* (2006) também verificaram que a recirculação do efluente aumentou a alcalinidade de um CSTR tratando efluentes da indústria de processamento de azeite (rico em lípidos). No caso de efluentes de lacticínios, a recirculação tornou um sistema UASB de duas fases auto-suficiente no que fiz respeito à regulação do pH e adição de alcalinidade (Garcia *et al.*, 1991). Nos reactores em estudo, a recirculação na fase de estabilização resultou de estudos prévios de optimização em termos da eficiência de metanização, comparativamente com a ausência de recirculação nessa fase (Nadais *et al.*, 2006). Neste trabalho, verificou-se que, exceptuando a carga I, a alcalinidade no efluente de saída dos reactores intermitentes foi sempre superior à adicionada. Quando a alcalinidade no efluente de saída é superior à de entrada de um digestor anaeróbio, significa que ocorreu produção de alcalinidade (Ramakrishnan e Gupta, 2008). A produção de alcalinidade está relacionada com a actividade dos microrganismos metanogénicos, como foi referido anteriormente, e por isso, a produção de alcalinidade nos reactores intermitentes poderá ser justificada com os benefícios da recirculação ao nível da eficiência de metanização global, e com o consequente efeito da metanogénese no aumento da alcalinidade.

Quanto às diferenças entre a fase de alimentação e estabilização, tem-se que, e apesar do pH ter sido sempre superior na segunda fase, a alcalinidade só o foi nas cargas mais elevadas (V, VI e VII), de um modo geral. Isto significa que na carga I, a fase de estabilização poderá ter sido detrimental, uma vez que resultou na diminuição da eficiência de metanização e da alcalinidade. O facto do pH aumentar nessa fase e nessa carga, estará relacionado com o consumo de alcalinidade devido aos processos referidos anteriormente.

Neste trabalho, a adição de alcalinidade por litro de alimentação não variou com as cargas investigadas. Apesar, de se ter observado, por vezes, a diminuição da alcalinidade média do efluente de saída entre cargas, ocorreu um aumento geral, em todos os reactores. Este fenómeno também foi observado por Banu *et al.* (2007) no tratamento de efluentes de lacticínios num reactor UASB-híbrido. Tal como este autor, a justificação para este aumento generalizado poderá ser a produção de NH_3 durante a desaminação dos aminoácidos, e por isso, o aumento da concentração de proteínas na alimentação ao longo do estudo ter contribuído para o aumento da alcalinidade ao longo das cargas.

Os valores médios do de AOV_T 's no efluente de saída variaram entre 0-112,8 mg Ac.L^{-1} no reactor A, entre 0-125,4 mg Ac.L^{-1} no reactor B e entre 4,52-114,1 mg Ac.L^{-1} no reactor C. Estes valores são inferiores aos que caracterizam a ocorrência de instabilidade na digestão anaeróbia (entre 200-500 mg Ac.L^{-1}) (Henze, 1997), e inferiores ao máximo permitido para uma digestão anaeróbia de lacticínios equilibrada (500 mg Ac.L^{-1}) (Van den Berg e Kennedy, 1983). Pode-se, assim, afirmar que ocorreu uma digestão equilibrada ao longo das cargas investigadas em todos os reactores, contudo, a passagem para a carga VII caracterizou-se pela ocorrência de um pico de AOV_T 's, com o valor máximo de 331 mg Ac.L^{-1} observado no reactor B. O facto de, na carga I, não ter sido detectada qualquer acumulação de AOV 's no efluente de saída dos reactores intermitentes, significa que os AOV 's produzidos foram rapidamente convertidos a metano pelos microrganismos metanogénicos. Assim, o facto da eficiência de metanização ter diminuído com a fase de estabilização, nessa carga, esteve possivelmente relacionada com a inibição da acidogénese. Na limitação da presença de AOV 's, a metanogénese diminuiu e a alcalinidade produzida durante este processo também. Além disso, o elevado pH observado nessa carga, não foi, por isso, detrimental à metanogénese. É importante referir que, a diminuição dos AOV 's entre a fase de alimentação e estabilização também foi observada no estudo de Nadais *et al.* (2005).

Os perfis de AOV 's obtidos durante a digestão anaeróbia de efluentes de lacticínios, contendo açúcares, proteínas e lípidos, dependem de uma variedade de factores como os enunciados no capítulo 2 da dissertação. De uma forma geral, os produtos da fermentação de açúcares são os ácidos butírico, acético e propiónico (Zoetemeyer *et al.*, 1982), da fermentação de proteínas são os ácidos acético, n-butírico, iso-valérico, n-valérico, iso-butírico e propiónico (Batstone *et al.*, 2003); e da oxidação dos AGCL, o ácido acético e propiónico (Angelidaki e Ahring, 1995).

Os ácidos acético e propiônico, comuns na digestão dos três grupos de compostos orgânicos presentes na alimentação, apareceram no efluente de saída de todos os reactores na carga VI e VII. Na carga VII, o ácido acético foi o AOV maioritário em todos os reactores, tal como o foi no estudo de Nadais *et al.* (2006), e a concentração de ácido propiônico apresentou valores acima do limite considerado para a estabilidade dos digestores anaeróbios de 50-100 mg Ac.L⁻¹ (Henze, 1997). Como o limite máximo de ácido acético (200 mg Ac.L⁻¹) para a presença de espécies do género *Methanosaeta* (Gunnerson e Stuckey, 1986), nunca foi atingido, sugere-se que espécies deste género tenham estado presentes. No entanto, devido à acumulação destes dois AOV's na última carga investigada, sugere-se que a oxidação sintrófica do propionato e a metanogénese acetotrófica não foi suficiente para a evitar. Segundo Park *et al.* (2009), o número de microrganismos metanogénicos aumenta com o tempo a uma dada carga, e assim se justifica a sua acumulação, sendo que, a oxidação sintrófica do propionato depende dos microrganismos metanogénicos hidrogenotróficos (Aivasidis e Diamantis, 2005). Provavelmente, e apesar da concentração de ácido propiônico ter sido superior ao limite de estabilidade, não ocorreu toxicidade, uma vez que foi inferior ao limite de toxicidade para os microrganismos metanogénicos de 1000 mg Ac.L⁻¹ (Gunnerson e Stuckey, 1986).

Noutras cargas, os AOV's maioritários foram sobretudo os ácidos n-valérico e caprónico. Estes ácidos foram já associados à fermentação de lactose e aminoácidos (Fang e Yu, 2001; Yu e Fang, 2001) e, por isso, também foram detectados na digestão anaeróbia de efluentes de lacticínios (Ghaly *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2002; Demirel e Yenigun, 2004). O ácido n-butírico apareceu de forma praticamente constante no efluente do reactor contínuo, mas também dos reactores intermitentes, em algumas cargas. A fermentação a butirato parece ter sido importante na carga II nos reactores intermitentes, devido à presença, em média, de 80% do ácido iso-butírico (dos AOV_T's) na fase de alimentação, no reactor A, e de 50% do ácido n-butírico no final do ciclo, no reactor B. Estes dados sugerem a presença de membros dos géneros *Clostridium*, conhecidos pela sua capacidade de fermentação a butirato nos reactores (Dinopoulou *et al.*, 1988). No final do ciclo, no reactor A, não foi detectado ácido iso-butírico, mas antes n-butírico em menor concentração, possivelmente devido à presença de um microrganismo acetogénico sintrófico, que realiza a acetogénese do primeiro, depois da sua isomeração, ao segundo (Lowe *et al.*, 1993).

A razão A/A, definida como a razão entre os AOV_T's e a alcalinidade, é usada como um parâmetro que define a estabilidade da digestão anaeróbia, recomendando-se valores inferiores a 0,4 (Parkin e Owen, 1986). Neste trabalho, e apesar do reactor contínuo ter apresentado o valor máximo de 0,08 na última carga investigada, em termos médios, não se verificou a ocorrência de instabilidade nesse reactor.

6.1.3 COMPARAÇÃO COM O ESTADO ESTACIONÁRIO

A comparação entre a carga VII, operada na fase 2 do plano experimental, e o estado estacionário, operado a uma Bv de 12 g CQO.L⁻¹.dia⁻¹, demonstrou que, a manutenção prolongada dessa carga se reflectiu, no global, em produções de metano mais elevadas, menores eficiências de remoção e maiores eficiência de metanização.

O facto de, em estado estacionário, a fase de estabilização ter contribuído em maior percentagem para a remoção da CQO e metanização da CQO removida na fase de alimentação, bem como para a produção de metano, sugere que, ao longo do tempo, a fase de estabilização adquiriu maior importância no desempenho dos reactores intermitentes. Esta sugestão é suportada pelos princípios das relações sintróficas que se estabelecem na cadeia trófica metanogénica, e pelo facto da fase de estabilização ser mais propícia à realização da metanogénese, como foi observado nesta fase do plano experimental através dos parâmetros de desempenho e AOV's, e durante a fase 2, através dos parâmetros de desempenho, alcalinidade, pH e AOV's. Assim, os microrganismos dependentes dos microrganismos metanogénicos parecem ter adaptado a sua actividade uma vez que, na fase de estabilização, seria superior.

A concentração de AOV_T's no efluente de saída foi ligeiramente superior nos reactores intermitentes, em estado estacionário, e semelhante no reactor contínuo. O perfil de AOV's no efluente de saída também foi diferente, sobretudo nos reactores intermitentes, tendo-se verificado que o ácido propiónico foi o AOV maioritário nestes reactores em estado estacionário. Este facto sugere que, ao longo do tempo, os microrganismos metanogénicos acetotróficos cresceram nos reactores e por isso, as concentrações de acetato foram diminuindo até ao valor de 7,6 mg Ac.L⁻¹ observado no final dos ciclos.

A acumulação de AOV_T's durante a fase de alimentação em estado estacionário foi praticamente o dobro da observada na carga VII, na fase 2 do plano experimental. Essa acumulação deveu-se maioritariamente à acumulação de ácido propiónico, o que sugere que, foram sobretudo os microrganismos capazes de realizar a oxidação sintrófica do ácido propiónico que verificaram o referido aumento de actividade na fase de estabilização.

A oxidação sintrófica do ácido propiónico pode ocorrer por três vias diferentes: a via das bactérias afiliadas com o cluster *Desulfomaculum* I, que envolve a produção de acetato e butirato como intermediários, a via sintrófica com microrganismos sulfato-redutores e a via sintrófica com microrganismos metanogénicos hidrogenotróficos (Ariesyady *et al.*, 2007; Rozej *et al.*, 2008). Num digestor anaeróbio, a quantidade de sulfato é limitada (0,01mM), e por isso, a via de oxidação do propionato é, por excelência, a primeira e última referidas, uma vez que ocorrem via sintrófica com microrganismos metanogénicos hidrogenotróficos através da transferência de hidrogénio ou formato inter-espécies (Ariesyady *et al.*, 2007; McInerney *et al.*, 2008).

A inibição da oxidação sintrófica do propionato na fase de alimentação poderá estar relacionada com a acumulação de acetato nessa fase. Apesar da relação sintrófica com os microrganismos metanogénicos acetotróficos não ser tão importante como com os

hidrogenotróficos (Kaspar e Wuhrmann, 1978; de Bok *et al.*, 2004;), Wu *et al.* (1996) determinaram que a oxidação sintrófica do propionato, em grânulos, só se realiza na presença dos acetotróficos. Segundo de Bok *et al.* (2004), a remoção do acetato produzido durante a oxidação sintrófica do propionato resulta num gradiente mais acentuado entre os microrganismos acetogénicos e os metanogénicos hidrogenotróficos, aumentando o fluxo de hidrogénio ou formato entre ambos. A adição de acetato na proporção de 2(propionato):1 (acetato), a uma co-cultura de *Smithella propionica* e *Methanospirillum hungatei*, inibiu a conversão do propionato (Liu *et al.*, 1999). Assim, a oxidação sintrófica do propionato poderia estar inibida na fase de alimentação, devido à insuficiente actividade dos microrganismos metanogénicos acetotróficos para remover o acetato do reactor.

Por outro lado, se a remoção de acetato estiver a ocorrer via sintrófica com formação de $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ pelos microrganismos acetogénicos e consequente metanogénese pelos microrganismos metanogénicos hidrogenotróficos (Hattori, 2008), a actividade destes últimos não seria suficiente para manter os níveis de hidrogénio necessários à oxidação sintrófica do propionato, como foi explicado no capítulo 2 da dissertação para a janela termodinâmica que se estabelece entre a $p\text{H}_2$ e a ΔG° da reacção (Aivasidis e Diamantis, 2005).

A inibição da oxidação sintrófica do propionato na fase de alimentação poderá ainda estar relacionada com a presença de lípidos, no caso destes últimos serem preferencialmente degradados nessa fase. Foi sugerido anteriormente, que a oxidação dos AGCL's resultantes da hidrólise dos triglicéridos do leite ocorreria preferencialmente no segundo dia de alimentação, comparativamente com o primeiro. Acontece que, além dos AGCL poderem inibir os microrganismos metanogénicos acetotróficos e hidrogenotróficos (Hanaki *et al.*, 1981; Rinzema *et al.*, 1994), a sua oxidação também depende sobretudo dos hidrogenotróficos para a remoção de hidrogénio (McInerney *et al.*, 1979; Gunnerson e Stuckey, 1986). Apesar dessa dependência, Angelidaki e Ahring (1995) demonstrou que os microrganismos capazes de realizar a oxidação dos AGCL não são tão sensíveis ao hidrogénio como os microrganismos capazes de realizar a oxidação dos ácidos gordos de cadeia curta, e por isso, poderiam ocorrer em fases distintas.

Resumindo, todos estes processos subentendem que o modo de funcionamento intermitente apresenta algumas semelhanças com a tecnologia de separação de fases, embora ocorrendo no mesmo reactor e com a maior produção de metano na primeira fase. As semelhanças com a tecnologia de separação de fases foram mais visíveis a uma Bv de 12 g CQO.L⁻¹.dia⁻¹ nas fases 1 e 2 do plano experimental, devido à maior acumulação de AOV's durante a fase de alimentação e seu desaparecimento na fase de estabilização. Em estado estacionário, a separação de fases parece referir-se, sobretudo, à ocorrência preferencial da oxidação sintrófica do propionato na fase de estabilização, com melhorias significativas ao nível da produção de metano e eficiência de metanização no global.

6.2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA

A caracterização biológica da biomassa foi realizada em amostras dos reactores B' e C', recolhidas no final da fase 1 do plano experimental.

A identificação de procariotas com base na sua morfologia é complexa devido à possibilidade de ocorrerem diferentes formas dentro do mesmo género, e a mesma forma entre géneros diferentes (Murray *et al.*, 1994), não sendo por isso uma técnica usada isoladamente na identificação de procariotas. Foi, no entanto, possível observar diferenças entre ambos os reactores e entre o sobrenadante e a biomassa no mesmo reactor, bem como também foi possível realizar a análise dos tipos morfológicos presentes. A análise dos tipos morfológicos foi realizada a uma ampliação de 1000x e por isso, é possível que contenha alguns erros de análise.

Da análise molecular, obteve-se um número total de clones semelhante entre os reactores B' e C'. Esse número reflecte a diversidade de clones presentes, não medindo a quantidade desses microrganismos nas amostras. Apesar de, em termos gerais, a diversidade ter sido a mesma em ambos os reactores, a sua distribuição pelos domínios, filos, famílias e géneros mais próximos foi diferente. Segundo Fernandez *et al.* (2000), a realização de um choque de glucose resultou em alterações, não só dos produtos obtidos, como também das populações microbianas, e quanto maior a diversidade inicial dessas populações, menor a sua alteração com a realização do choque. Ariesyady *et al.* (2007) também verificaram que alterações periódicas na adição de propionato resultou numa população microbiana dinâmica e diversa que permitia manter uma produção estável de metano. Neste estudo, o modo de operação intermitente favoreceu uma maior diversidade de clones do domínio Arquea (30,3%) comparativamente com o modo de operação contínua (12,4%). Os membros do domínio Arquea pertenceram ao filo Euryarchaeota, o dos microrganismos metanogénicos (Garcia *et al.*, 2000). Assim pode-se afirmar que o modo de operação intermitente favoreceu a ocorrência de uma maior diversidade dos microrganismos metanogénicos, comparativamente com o modo de operação contínua, que apresentou, por sua vez, uma comunidade metanogénica mais simples e uma comunidade de bactérias mais diversa. Tal como foi sugerido anteriormente neste capítulo, a ocorrência de períodos de “fome” devido à menor razão F/M na fase de estabilização, e que se traduziu num processo semelhante ao da tecnologia de separação de fases devido à maior acumulação de AOV's na fase de alimentação, embora no mesmo reactor e com a maior produção de metano na fase de alimentação, poderá ter sido a pressão selectiva que induziu uma maior diversidade de microrganismos metanogénicos no reactor intermitente.

No filo Euryarchaeota, os clones dos reactores B' e C' apresentaram semelhanças com clones próximos dos géneros *Methanosaeta* e *Methanobacterium*. Esses clones, e para os clones que ainda não têm publicações associadas, apenas se poderá interpretar a sua função nos reactores em estudo a partir das características do género mais próximo. Para os clones contendo publicações associadas, apresentam-se os números de acesso do *Genbank*, neste capítulo da dissertação, uma vez que, na sua maioria, a sua função não foi discutida nessas publicações. O

género *Methanosaeta*, da família Methanosaetaceae, foi já referido neste capítulo da dissertação, e mesmo sugerida a sua presença devido às concentrações de ácido acético no efluente de saída dos reactores em estudo. Durante a caracterização morfológica da biomassa, observou-se, contudo, células do tipo sarcina, que são, por norma, associadas, em sistemas de digestão anaeróbia, a membros do género *Methanosarcina* (Mah *et al.*, 1978). O facto de não terem sido detectados clones próximos a este género nos reactores em estudo não significa que não possam existir, uma vez que a análise apenas permite dizer que os clones detectados estão presentes, podendo existir outros. Por outro lado, e como foi referido anteriormente, géneros diferentes de microrganismos poderão apresentar a mesma morfologia, e, por isso, não quer necessariamente dizer que o tipo morfológico detectado corresponda a membros do género *Methanosarcina*. Os membros do género *Methanobacterium*, da família Methanobacteriaceae, são microrganismos metanogénicos hidrogenotróficos (Whitman *et al.*, 2000). É interessante notar, que a maior diferença na diversidade de clones do filo Euryarchaeota entre o reactor B' e C' foi observada para os clones próximos deste género. A importância dos microrganismos metanogénicos hidrogenotróficos para o modo de operação intermitente foi já sugerida anteriormente, e este resultado demonstra-o.

Relativamente às famílias e géneros próximos do domínio Eubacteria discutiremos também as possíveis funções dos clones detectados.

A família Veillonellaceae caracteriza-se pela capacidade de fermentação do lactato em alguns géneros. O género característico da família é o género *Veillonella*, capaz de fermentar lactato, piruvato e succinato com produção de CO₂, H₂, acetato e propionato (Rogosa, 1971). Clones dos reactores B' e C' apresentaram semelhança com clones próximos desta família. Em sistemas de digestão anaeróbia, o género *Veillonella* apenas foi identificado num reactor descontínuo sequencial (*Sequence Batch Reactor*, SBR) tratando amido (Arooj *et al.*, 2007). No reactor C', duas OTU's, equivalentes a 5,6% dos clones apresentaram semelhança com os clones UBC 1426 e 1337, isolados de um sistema de lamas activadas com baixos níveis de oxigénio (números de acesso: AB286539.1. e AB286503.1). No reactor C' houve ainda clones desta família semelhantes (alguns com 100% de semelhança) a clones próximos do género *Anaeromusa*. Este género caracteriza-se pela fermentação e oxidação de aminoácidos com formação de acetato, propionato e succinato, com capacidade de fermentar açúcares também (Baena *et al.*, 1999a), e foi pela primeira vez isolado de um digestor tratando efluentes de uma fábrica de processamento de batata (Nanninga *et al.*, 1987).

Na família Clostridiaceae, os clones detectados em ambos os reactores foram semelhantes a um clone próximo do género *Clostridium*. Este género poderá estar presente nos reactores em estudo devido à sua capacidade de fermentação de açúcares (Collet *et al.*, 2004; Ferchichi *et al.*, 2005; Calli *et al.*, 2008; Song e Dongi, 2008; Li *et al.*, 2009), de aminoácidos (McInerney, 1988), ou mesmo devido à sua capacidade de hidrólise de triglicéridos (Cirne *et al.*, 2006).

Na família Ruminococcaceae, apenas clones do reactor B' foram semelhantes (com apenas 94% de semelhança) a um clone próximo do género *Anaerofilum*. Este género caracteriza-se pela capacidade de fermentação de uma variedade de mono e dissacáridos, embora não fermente a lactose, com produção de lactato, acetato, etanol, formato, 2,3-butanediol e CO₂. As espécies conhecidas foram isoladas de um digestor municipal e de um digestor tratando efluentes de uma fábrica de produtos químicos (Zellner *et al.*, 1996).

Na família Syntrophomonadaceae, apenas clones do reactor B' foram semelhantes à espécie *Syntrophomonas* subsp. *saponavida* e a um clone próximo do género *Syntrophomonas*. Esta família é, por excelência, a família das bactérias capazes de realizar a oxidação de AGCL's (Roy *et al.*, 1986; Lorowitz *et al.*, 1989; Pereira *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Hatamoto *et al.*, 2007a; Hatamoto *et al.*, 2007b; Hatamoto *et al.*, 2007c; Sousa *et al.*, 2007a; Sousa *et al.*, 2007b; Sousa *et al.*, 2007c), embora também seja reconhecida a capacidade de oxidação de AGCL's na família Syntrophaceae (Grabowski *et al.*, 2005). A espécie *Syntrophomonas* subsp. *saponavida*, tem a capacidade de oxidar ácidos gordos saturados contendo 4-18 carbonos com produção de acetato e H₂ (a partir de butirato e AGCL com nº par de carbonos); com produção de acetato, propionato e H₂ (a partir de n-valerato, AGCL com nº ímpar de carbonos e 2-metilbutirato); ou com produção de acetato, iso-valerato e H₂ (a partir de iso-ácidos) (Lorowitz *et al.*, 1989). Tendo em conta que, os AGCL's de cadeia saturada presentes nos triglicéridos do leite são os ácidos palmítico (16:0), mirístico (14:0) e esteárico (18:0) (Jensen e Newburg, 1995), esta bactéria poderá ser responsável no reactor B' pela oxidação dos mesmos com produção de acetato e H₂ (Lorowitz *et al.*, 1989). Os outros clones do reactor B' do género *Syntrophomonas*, apresentaram semelhanças com o clone BHB03, isolado de um CSTR tratando butirato (que contém 4 carbonos) como única fonte de carbono (número de acesso: AB248632.1).

Na família Peptococcaceae, clones de ambos os reactores foram semelhantes a um clone próximo do género *Desulfosporosinus*, embora com apenas 92% de semelhança em ambos os reactores. O género é conhecido pela sua capacidade de reduzir sulfato a sulfito na presença de lactato e piruvato. No entanto, dado que anteriormente foi referido que em digestores anaeróbios, a concentração de sulfato é demasiado baixa para a ocorrência de processos de redução de sulfato (Ariesyady *et al.*, 2007), a presença deste género poderá dever-se à sua capacidade de realizar a reacção homoacetogénica clássica (Stackebret *et al.*, 2003). A detecção de clones próximos a este género não deixa de ser interessante, uma vez que, na mesma família existe o género *Desulfotomaculum*, e no cluster *Desulfomaculum* I é reconhecida a capacidade de oxidação do propionato por uma via característica envolvendo a produção de acetato e butirato como intermediários (Ariesyady *et al.*, 2007; Rozej *et al.*, 2008). O clone com o qual foi estabelecida a semelhança foi isolado de um digestor mesofílico alimentado a butirato (número de acesso: AB330862.1).

Na família Streptococcaceae, clones de ambos os reactores apresentaram semelhança com clones próximos dos géneros *Streptococcus*, enquanto que apenas o reactor C' apresentou semelhanças com clones próximos do género *Lactococcus*. O género *Streptococcus* tem a

capacidade de realizar a fermentação de açúcares, nomeadamente da lactose (LeBlanc *et al.*, 1979; Poolman *et al.*, 1987). Em digestores anaeróbios, foi identificado por Fernandez *et al.* (2000). Os clones com os quais foram estabelecidas as semelhanças foram, no entanto, isolados do intestino e epiderme humana (números de acesso: EU475800.1, GQ082142.1 e EU772602.1). O género *Lactococcus* tem também a capacidade de realizar a fermentação de açúcares, nomeadamente da lactose (Thomas *et al.*, 1979; Coccagn-Bousquet *et al.*, 2002). Em digestores anaeróbios, foi identificado por Lee *et al.* (2004). Clones do reactor C' foram próximos da espécie *Lactococcus lactis*, cujas vias metabólicas de fermentação da glucose foram já apresentadas no capítulo 2 da dissertação.

Na família Anaerolineaceae, apenas clones do reactor B' foram semelhantes a um clone próximo do género *Levilinea*. O género *Levilinea* apenas contém uma espécie conhecida até à data. Trata-se da espécie *L. saccharolytica*, capaz de fermentar açúcares, maioritariamente, podendo também crescer em peptona (proteína modelo), embora com menor crescimento. Foi isolada de um digestor UASB tratando efluentes de uma fábrica de processamento de açúcares (Yamada *et al.*, 2006). O clone com o qual foram estabelecidas as semelhanças foi detectado num digestor anaeróbio de lamas de ETAR (número de acesso: CU926801.1).

Na família Enterobacteriaceae, clones de ambos os reactores apresentaram semelhanças com um clone desta família, com 100% de semelhança. Esse clone foi isolado de saliva humana (número de acesso: EU996470.1). A família Enterobacteriaceae caracteriza-se pela capacidade de crescimento em peptona e de fermentar açúcares e alcóois. Várias espécies são patogénicas (Brenner e Farmer, 2002). A pesquisa das publicações associadas à presença desta família de bactérias em sistemas de digestão anaeróbia resultou maioritariamente em publicações referentes aos processos de higienização de resíduos e efluentes. No entanto, devido à sua capacidade de fermentação, foram já isolados de fermentadores alimentados a glucose para a produção de H₂ (Fang *et al.*, 2002; Iyer *et al.*, 2004). A detecção de clones desta família, neste estudo, não deixa de ser, no entanto, interessante, e serve de alerta para os cuidados a ter na manipulação das lamas destes reactores devido às características de patogenicidade da família, tal como foi sugerido por Fang *et al.* (2002). Apenas clones do reactor C' apresentaram semelhança com clones próximos dos géneros *Enterobacter* e *Klebsiella*. Estes géneros caracterizam-se pela capacidade de fermentação de açúcares (Grimont e Grimont, 2002a; Grimont e Grimont, 2002b).

Na família Desulfovibrionaceae, apenas clones do reactor B' foram semelhantes a clones próximos do género *Desulfovibrio*. Este género caracteriza-se pela sua capacidade de redução do sulfato, embora a sua presença no reactor B' se possa dever à sua capacidade de fermentar compostos orgânicos (como, por exemplo, o lactato com produção de acetato) (Kuever *et al.*, 2002). Um dos clones, com o qual foi estabelecida semelhança, foi detectado num reactor de leiteo fluidizado tratando efluentes ricos em sulfato e metais, e esse clone apresentou apenas 62% de semelhança com *D. alcoholovorans* (número de acesso: CU926801.1). A espécie *D. alcoholovorans* caracteriza-se por uma elevada capacidade de fermentação de alcóois (Kuever *et al.*, 2002). Também foi já isolada uma espécie deste género de um reactor UASB tratando

efluentes de uma fábrica de queijo com capacidade de fermentar piruvato e alguns aminoácidos (Hernandez-Eugenio *et al.*, 2000)

Na família Syntrophaceae, clones de ambos os reactores apresentaram semelhanças com um clone próximo do género *Syntrophus*. Apesar da capacidade de oxidação de estereato e heptadecanoato ter sido reconhecida neste género (Grabowski *et al.*, 2005), caracteriza-se, sobretudo pela capacidade de realizar a oxidação sintrófica de ácidos gordos (Rozej *et al.*, 2008). Como não foram detectados clones semelhantes ao género *Syntrophomonas* no reactor C', e apesar das reservas relativas a esta análise, por poderem existir outros microrganismos além dos que foram detectados, sugere-se que o género *Syntrophus* esteve envolvido neste reactor na oxidação de AGCL. Como no reactor B', as semelhanças foram estabelecidas com o mesmo clone que apresentou semelhanças com o reactor C', sugere-se que a sua função no reactor B' poderá ser a mesma. No entanto, clones do reactor B' apresentaram semelhanças com um clone próximo do género *Syntrophomonas*, cuja função não foi ainda estabelecida. De qualquer forma, e apesar do reactor C' ter apresentado, no global, maior diversidade de bactérias, a degradação de AGCL no reactor B' parece, no entanto, envolver uma comunidade de bactérias mais diversa.

Na família Spirochaetaceae, clones de ambos os reactores foram semelhantes a clones próximos do género *Treponema*, com 100% de semelhança em ambos. Os clones com os quais foram estabelecidas as semelhanças foram detectados em infecções orais e saliva humana (números de acesso: EU985338.1 e AB465691.1). Apesar disso, o género *Treponema* foi já detectado em sistemas de digestão anaeróbia (Delbes *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). No estudo de Zhang *et al.* (2009), a presença deste género foi atribuída à realização da homoacetogénese, e assim sendo, nos reactores em estudo poderia estar a contribuir para o consumo de H₂ e para o fornecimento dos substratos do género *Methanosaeta*. Esta hipótese é suportada pelo facto de ter aparecido só depois dos níveis de acetato terem aumentado num digestor anaeróbio alimentado a glucose como única fonte de carbono (Delbes *et al.*, 2001).

Na família Synergistaceae, clones do reactor B' foram semelhantes a um clone próximo do género *Synergistes*, enquanto que no reactor C', foram semelhantes a clones próximos do género *Aminomonas*. Os clones, com os quais foram estabelecidas as semelhanças, foram detectados num digestor anaeróbio tratando lamas de ETAR (números de acesso: CU925553.1, CU926925.1 e CU920846.1). Os membros desta família são comuns em digestores anaeróbios tratando efluentes ricos em proteínas. A capacidade proteolítica foi observada em vários membros desta família (Ex.: *Aminomonas paucivorans*). Alguns apresentam, além da capacidade proteolítica, capacidade sacarolítica (Ex. *Synergistes jonesii*). Também fermentam os produtos de hidrólise (Vartoukian *et al.*, 2007). A diminuição da presença do género *Synergistes* após o aumento de acetato num digestor anaeróbio, foi atribuída à sua capacidade de fermentar lactato e às alterações na via de degradação da glucose com o aumento de acetato no sistema (Delbes *et al.*, 2001). O género *Aminomonas* apenas contém uma espécie conhecida até à data. Trata-se da espécie *A. paucivorans*, capaz de fermentar péptidos e aminoácidos e sem capacidade de fermentar açúcares. Na presença de *Methanobacterium formicum*, os produtos maioritários de

fermentação alteraram-se de acetato para propionato. Foi isolada pela primeira vez de uma lagoa anaeróbia tratando efluentes de lacticínios (Baena *et al.*, 1999b). Este género também foi detectado no estudo de Tang *et al.* (2005), num digestor alimentado a albumina como única fonte de carbono.

Na família Propionibacteriaceae, clones de ambos os reactores foram semelhantes a clones próximos do género *Propionibacterium*, com 100% no caso do reactor C'. Este género caracteriza-se pela capacidade de fermentar hexoses com produção de propionato e acetato. As primeiras estirpes foram isoladas de produtos de lacticínios, embora tenham já sido detectados em sistemas de digestão anaeróbia (Cummins e Johnson, 2000). A capacidade de hidrolisar triglicéridos foi também reconhecida na estirpe LIP4 deste género (Jarvis *et al.*, 1998). Embora não fermente AGCL, a sua capacidade de hidrólise de triglicéridos poderá ser atribuída à capacidade de fermentação do glicerol, tal como acontece no género *Clostridium* (Cirne *et al.*, 2006).

O resumo das possíveis funções atribuídas aos clones detectados nos reactores em estudo apresenta-se na Tabela 19.

Tabela 19. Resumo das possíveis funções atribuídas aos clones detectados nos reactores intermitente (B') e contínuo (C').

Função dos organismos detectados	Reactor	
	B'	C'
Hidrólise de proteínas	<i>Levilinea</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Synergistes</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Aminomonas</i>
Hidrólise de lípidos	<i>Clostridium</i> <i>Propionibacterium</i>	<i>Clostridium</i> <i>Propionibacterium</i>
Hidrólise e fermentação de açúcares	<i>Clostridium</i> <i>Anaerofilum</i> <i>Streptococcus</i> <i>Levilinea</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Desulfovibrio</i> <i>Synergistes</i> <i>Propionibacterium</i>	<i>Clostridium</i> <i>Anaeromusa</i> <i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Propionibacterium</i>
Fermentação de lactato	<i>Veillonellaceae</i> <i>Streptococcus</i> <i>Desulfovibrio</i> <i>Synergistes</i>	<i>Veillonellaceae</i> <i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Lactococcus lactis</i>
Fermentação de aminoácidos	<i>Clostridium</i> <i>Desulfovibrio</i> <i>Synergistes</i>	<i>Anaeromusa</i> <i>Clostridium</i> <i>Aminomonas</i>
Oxidação de AGCL	<i>Syntrophomonas wolfei</i> subsp. <i>saponavida</i> <i>Syntrophomonas</i> <i>Syntrophus</i>	<i>Syntrophus</i>
Acetogénese	<i>Syntrophomonas</i> <i>Desulfosporosinus</i> <i>Syntrophus</i> <i>Treponema</i>	<i>Desulfosporosinus</i> <i>Syntrophus</i> <i>Treponema</i>
Metanogénese	<i>Methanosaeta</i> <i>Methanobacterium</i>	<i>Methanosaeta</i> <i>Methanobacterium</i>

O facto de, apenas alguns clones terem apresentado semelhança com duas espécies conhecidas, levanta a possibilidade da maioria dos clones detectados poderem ser novas estirpes ou espécies, tal como foi sugerido por Zellner *et al.* (1997). Segundo estes autores, isso é um fenómeno comum em digestores anaeróbios. A compreensão da função efectiva dos clones detectados deve ser investigada em estudos posteriores.

7

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1 CONCLUSÕES

Nesta dissertação, comparou-se o desempenho de reactores UASB com modo de funcionamento intermitente e contínuo no tratamento de efluentes de laticínios durante o, que se designou de arranque, até uma Bv global de $12 \text{ g CQOT.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

As condições de arranque foram diferentes de estudos anteriores, nomeadamente no tempo de arranque até essa carga, nas lamas usadas inicialmente para inocular os reactores e nas cargas seleccionadas. Estas diferenças reflectiram-se em diferenças na eficiência de remoção e metanização.

Durante o arranque, os reactores intermitentes apresentaram produções de metano e eficiências de metanização superiores ao reactor contínuo (excepto à Bv 3-4,5 $\text{g CQOT.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ no reactor B). A eficiência de remoção foi praticamente constante ao longo das cargas investigadas, e por isso, não é um parâmetro que deva ser usado para monitorização do efeito de mudança de carga nestes reactores. A eficiência de remoção foi superior nos reactores intermitentes à Bv 8-12 $\text{g CQOT.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. As diferenças entre os reactores intermitentes poderão dever-se ao aparecimento de microrganismos fototróficos no reactor B.

A comparação com o estado estacionário, a uma Bv global de $12 \text{ g CQOT.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ durante cerca de 2 anos, foi útil no entendimento do modo de funcionamento intermitente e que, a essa carga, apresenta um funcionamento semelhante ao da tecnologia de separação de fases, embora no mesmo reactor e com a maior produção de metano a ocorrer na fase de alimentação. No estado estacionário observou-se que a fase de estabilização adquiriu maior importância na remoção da CQO e metanização da CQO removida, com melhorias significativas na produção de metano e eficiência de metanização globais, comparativamente com os valores obtidos nessa carga durante o arranque e comparativamente com o modo de operação contínua em estado estacionário. A justificação para este facto baseia-se na realização preferencial da

oxidação sintrófica do propionato na fase de estabilização. Foram sugeridas três hipóteses para este acontecimento.

Com a caracterização molecular da biomassa do reactor contínuo e intermitente, observou-se que o modo de operação intermitente influenciou o aparecimento de uma população de microrganismos metanogénicos mais diversificada do que no modo de operação contínua, e essa diferença foi superior no que se refere aos microrganismos metanogénicos hidrogenotróficos. Apesar do modo de operação intermitente se reflectir numa menor diversidade de bactérias do que o modo de operação contínua, apresentou também maior diversidade de bactérias envolvidas na oxidação sintrófica de AGCL.

Com os resultados obtidos, pode-se sugerir que a oxidação sintrófica dos AGCL resultantes da hidrólise dos triglicéridos do leite, na fase de alimentação, ocorreu sobretudo no segundo dia de alimentação, o que terá provocado inibição da oxidação sintrófica do propionato nessa fase. Com a fase de estabilização, a actividade dos microrganismos metanogénicos foi favorecida e os níveis de H_2 necessários à oxidação sintrófica do propionato foram estabelecidos. Neste estudo, apenas foi atribuída a capacidade de oxidação sintrófica do propionato ao género *Syntrophus*, também presente no reactor contínuo. No reactor contínuo parece estar envolvido na oxidação de AGCL, enquanto que no reactor intermitente, dada a diversidade de clones do género *Syntrophomonas*, poderá estar envolvido apenas na oxidação de propionato.

7.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Com esta dissertação observou-se que a realização preferencial da oxidação sintrófica do propionato na fase de estabilização é, possivelmente, a justificação para as melhorias da produção de metano com o modo de funcionamento intermitente a uma Bv de 12 g CQOT.L⁻¹.dia⁻¹. Seria interessante verificar, realmente, que espécies estão envolvidas neste processo e se esse acontecimento se deveu às hipóteses levantadas nesta dissertação. A monitorização do número de bactérias capazes de realizar a oxidação sintrófica do propionato e dos AGCL, e do número de microrganismos metanogénicos hidrogenotróficos ao longo de um ciclo de operação poderá fornecer essa resposta. Por outro lado, o fornecimento de propionato marcado radioactivamente e a análise dos microrganismos com marcação associada permitiria determinar com exactidão quais os microrganismos envolvidos nesse processo. Como a maioria dos clones detectados não apresentaram semelhanças com microrganismos cultivados e de função conhecida, e a interpretação da sua função baseou-se nas características do género mais próximo, a tentativa de cultivo desses microrganismos, permitiria investigar em pormenor as suas capacidades e mecanismos de inibição. Sugere-se que os clones do género *Syntrophus* merecem particular atenção neste caso.

A realização preferencial da oxidação sintrófica do propionato na fase de estabilização verificou-se para a Bv de 12 g CQOT.L⁻¹.dia⁻¹ em estado estacionário. Será que a adição de propionato na fase de estabilização, noutras cargas ou na mesma carga após o arranque, estimularia o desenvolvimento de comunidades com o mesmo efeito ao nível do desempenho dos reactores? Ou dado que, por princípio, as comunidades serão diferentes, teria um efeito detrimental?

Seria também interessante analisar as comunidades presentes nas outras cargas investigadas, em que não foi possível observar a referida separação de fases em termos de acumulação de AOV's.

Todo este conhecimento permitiria decifrar os mecanismos que estão subjacentes ao aparecimento de diferentes populações microbianas com o modo de operação intermitente, e poderá fornecer o conhecimento necessário à melhoria do seu desempenho, nomeadamente, após a ocorrência de situações críticas que caracterizam o funcionamento dos digestores anaeróbios à escala real.

8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência para a Energia (ADENE) e Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI). 2001. FORUM “Energias Renováveis em Portugal”- Relatório Síntese. Ondagrafe, Lisboa, Portugal. Disponível em: http://e-geo.ineti.pt/edicoes_online/diversos/energias_renov/indice.htm.
- Agência Regional de Energia e Ambiente do Centro (AREAC), 2004. A situação portuguesa dos resíduos agro-pecuários: potencialidades da valorização energética de biogás. Jornadas "Os resíduos em Portugal e no Mundo", Escola Superior Agrária de Coimbra, Coimbra, Portugal, 3-4 Março 2004.
- Direcção Geral de Energia e Geologia (DGEG), 2009. Renováveis - estatísticas rápidas. Disponível em: <http://www.dgge.pt/>. Acedido a: 24 Agosto 2009.
- Aivasidis, A., Diamantis, V.I., 2005. Biochemical reaction engineering and process development in anaerobic wastewater treatment. in: K. Udo (Ed.), Technology transfer in biotechnology: from lab to industry to trodution. Springer-Verlag Berlin, Berlin, págs. 49-76.
- Alosta, H., Lalman, D.J.A., Bellmer, J.D., 2004. Glucose fermentation in the presence of linoleic, oleic and stearic acids by a mixed culture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 327-334.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1992. Effects of free long-chain fatty-acids on termophilic anaerobic-digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, 808-812.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1995. Establishment and characterization of an anaerobic thermophilic (55°C) enrichment culture degrading long-chain fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2442-2445.
- Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Domiguez-Espinosa, R., 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology*, 22, 477-485.
- Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Venetsaneas, N., Kornaros, M., Lyberatos, G., 2008. Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 47, 5227-5233.
- APHA, 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 ed. McGraw-Hill International Editions, Nova Iorque.
- Appels, L., Baeyens, J., Degreve, J., Dewil, R., 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 755-781.
- Ariesyady, H., Ito, T., Yoshiguchi, K., Okabe, S., 2007. Phylogenetic and functional diversity of propionate-oxidizing bacteria in an anaerobic digester sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 673-683.
- Arooj, M.F., Han, S.-K., Kim, S.-H., Kim, D.-H., Shin, H.-S., 2007. Sludge characteristics in anaerobic SBR system producing hydrogen gas. *Water Research*, 41, 1177-1184.

- Azbar, N., Dokgoz, F.T.C., Keskin, T., Korkmaz, K.S., Syed, H.M., 2009. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7441-7447.
- Backman, R.C., Blanc, F.C., O'Shaughnessy, J.C., 1985. The treatment of dairy wastewater by the anaerobic upflow packed bed reactor. Proceedings of 40th Purdue Industrial Waste Conference, págs. 361-372.
- Baena, S., Fardeau, M.-L., Woo, T.H.S., Ollivier, B., Labat, M., Patel, B.K.C., 1999a. Phylogenetic relationships of three amino-acid-utilizing anaerobes, *Selenomonas acidaminovorans*, '*Selenomonas acidaminophila*' and *Eubacterium acidaminophilum*, as inferred from partial 16S rDNA nucleotide sequences and proposal of *Thermanaerovibrio acidaminovorans* gen. nov., comb. nov. and *Anaeromusa acidaminophila* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 969-974.
- Baena, S., Fardeau, M.L., Ollivier, B., Labat, M., Thomas, P., Garcia, J.L., Patel, B.K.C., 1999b. *Aminomonas paucivorans* gen. nov., sp. nov., a mesophilic, anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 975-982.
- Bai, M.D., Cheng, S.S., Chao, Y.C., 2004. Effects of substrate components on hydrogen fermentation of multiple substrates. *Water Science and Technology*, 50, 209-216.
- Bal, A.S., Dhagat, N.N., 2001. Upflow anaerobic sludge blanket reactor--a review. *Indian Journal of Environmental Health*, 43, 1-82.
- Banu, J., Kaliappan, S., Yeom, I.-T., 2007. Two-stage anaerobic treatment of dairy wastewater using HUASB with PUF and PVC carrier. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12, 257-264.
- Barbirato, F., Chedaille, D., Bories, A., 1997. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 441-446.
- Batowska, A., Gardebroek, C., Nesha Turi, K., Banse, M., Wijnes, J.H.M., K.J., P., 2009. Competitiveness of the EU dairy industry. in: G.M.L. Tacken (Ed.). LEI Wageningen, Holanda, págs. 100.
- Batstone, D.J., Pind, P.F., Angelidaki, I., 2003. Kinetics of thermophilic, anaerobic oxidation of straight and branched chain butyrate and valerate. *Biotechnology and Bioengineering*, 84, 195-204.
- Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., Weleer, T., 2008. Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 492-499.
- Bhunja, P., Ghangrekar, M.M., 2008. Influence of biogas-induced mixing on granulation in UASB reactors. *Biochemical Engineering Journal*, 41, 136-141.
- Blaut, M., 1994. Metabolism of methanogens. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66, 187-208.
- Boone, D.R., 1982. Terminal reactions in the anaerobic digestion of animal waste. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 57-64.
- Borja, R., Banks, C.J., 1994. Kinetics of an upflow anaerobic sludge blanket reactor treating ice-cream wastewater. *Environmental Technology*, 15, 219-232.
- Borja, R., Banks, C.J., 1995. Anaerobic digestion of ice-cream wastewater: A comparison of single and two-phase reactor systems. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 466-471.
- Brenner, D.J., Farmer, J.J., 2002. Family I. Enterobacteriaceae. in: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag, Nova Iorque, E.U.A., págs. 587-607.
- Breure, A.M., Mooijman, K.A., Eel, J.G., 1986b. Protein degradation in anaerobic digestion: influence of volatile fatty acids and carbohydrates on hydrolysis and acidogenic fermentation of gelatin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24, 426-431.
- Britz, T.J.a.C., van Schalkwyk, C., Hung, Y.-T., 2006. Treatment of dairy processing wastewaters. in: L.K. Wang, Y.-T. Hung, H.H. Lo, C. Yapijakis (Eds.), *Waste treatment in the food processing industry*. CRC Press, E.U.A., págs. 1-28.
- Bryant, M.P., Wolin, E.A., Wolin, M.J., Wolfe, R.S., 1967. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Archives of Microbiology*, 59, 20-31.
- Buzzini, A.P., Pires, E.C., 2007. Evaluation of a upflow anaerobic sludge blanket reactor with partial recirculation of effluent used to treat wastewaters from pulp and paper plants. *Bioresource Technology*, 98, 1838-1848.

- Calado, A., 2009. Comunicação pessoal. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal.
- Calli, B., Schoenmaekers, K., Vanbroekhoven, K., Diels, L., 2008. Dark fermentative H₂ production from xylose and lactose - Effects of on-line pH control. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 522-530.
- Carawan, R.E., Jones, V.A., Hansen, A.P., 1979. Wastewater characterization in a multiproduct dairy. *Journal of Dairy Science*, 62, 1243-1251.
- Carcoba, R., Pin, C., Rodriguez, A., 2004. Growth and metabolic behaviour of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* IPLA 947 in anaerobic lactose-limited chemostat cultures. *European Food Research and Technology*, 219, 277-281.
- Castello, E., Santos, C.G.Y., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., Etchebehere, C., 2009. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 5674-5682.
- CE, 1997. Energia para o futuro: fontes de energia renováveis - Livro Branco para uma Estratégia e um Plano de Acção Comunitário, Acedido a: 17-07-2009. Disponível em: http://europa.eu/documents/comm/white_papers/pdf/com97_599_pt.pdf.
- Chartrain, N., Zeikus, J.G., 1986. Microbial ecophysiology of whey biomethanation: intermediary metabolism of lactose degradation in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 180-187.
- Christie, W.W., 1994. Composition and structure of milk lipids. in: P.F. Fox (Ed.) Advanced dairy chemistry Volume 2: Lipids. Chapman and Hall, Londres, Reino Unido.
- Chynoweth, D.P., Mah, R.A., 1971. Volatile acid formation in sludge digestion. in: R.F. Gould (Ed.) Anaerobic biological treatment processes. American Chemical Society, Washington, E.U.A.
- Chynoweth, D.P., Mah, R.A., 1977. Bacterial populations and end products during anaerobic sludge fermentation of glucose. *Journal Water Pollution Control Federation*, 49, 405-412.
- Cirne, D.G., Björnsson, L., Alves, M., Mattiasson, B., 2006. Effects of bioaugmentation by an anaerobic lipolytic bacterium on anaerobic digestion of lipid-rich waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 1745-1752.
- Cocaign-Bousquet, M., Even, S., Lindley, N.D., Loubière, P., 2002. Anaerobic sugar catabolism in *Lactococcus lactis*: genetic regulation and enzyme control over pathway flux. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 24-32.
- Cohen, A., Thiele, J.H., Zeikus, J.G., 1994. Pilot-scale anaerobic treatment of cheese whey by the substrate shuttle process. *Water Science and Technology*, 30, 433-442.
- Collet, C., Adler, N., Schwitzguebel, J.P., Peringer, P., 2004. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 1479-1485.
- Conklin, A., Stensel, H.D., Ferguson, J., 2006. Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion. *Water Environment Research*, 78, 486-496.
- Cordoba, P.R., Francese, A.P., Sineriz, F., 1995. Improved performance of a hybrid design over an anaerobic filter for the treatment of dairy industry wastewater at laboratory scale. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79, 270-272.
- Cordoba, P.R., Riera, F.S., Sineriz, F., 1984. Treatment of dairy wastewater with an anaerobic filter. *Biotechnology Letters*, 6, 753-758.
- Cummins, C.S., Johnson, J.L., 2000. The genus *Propionibacterium*. in: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer (Eds.), The Procarotes. Springer-Verlag, Nova Iorque, E.U.A., págs. 836-849.
- Danalewich, J.R., Papagiannis, T.G., Belyea, R.L., Tumbleson, M.E., Raskin, L., 1998. Characterization of dairy waste streams, current treatment practices, and potential for biological nutrient removal. *Water Research*, 32, 3555-3568.
- de Bok, F.A.M., Plugge, C.M., Stams, A.J.M., 2004. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Research*, 38, 1368-1375.
- De Haast, J., Britz, T.J., 1987. Characterization of some anaerobic bacteria from the liquid phase of a mesophilic anaerobic digester fed with a pre-fermented cheese whey substrate. *Microbial Ecology*, 14, 167-177.

- deGooijer, C.D., Bakker, W.A.M., Beefink, H.H., Tramper, J., 1996. Bioreactors in series: An overview of design procedures and practical applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 202-219.
- Delbes, C., Moletta, R., Godon, J.J., 2001. Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 19-26.
- Demirel, B., Yenigun, O., 2004. Anaerobic acidogenesis of dairy wastewater: the effects of variations in hydraulic retention time with no pH control. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 755-760.
- Demirel, B., Yenigun, O., Onay, T.T., 2005. Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. *Process Biochemistry*, 40, 2583-2595.
- Di Berardino, S., Di Berardino, M.A., 2008. Implementing biogas systems in Portugal: old barriers and future needs. *Bioenergy: Challenges and Opportunities*, Universidade do Minho, Guimarães, Portugal. 6-9 Abril.
- Diekert, G., 2000. The acetogenic bacteria. in: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, Nova Iorque, E.U.A., págs. 517-533.
- Dighe, A.S., Shouche, Y.S., Ranade, D.R., 1998. *Selenomonas lipolytica* sp. nov., an obligately anaerobic bacterium possessing lipolytic activity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 783-791.
- Dinopoulou, G., Rudd, T., Lester, J.N., 1988. Anaerobic acidogenesis of a complex wastewater: I. The influence of operational parameters on reactor performance. *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 958-968.
- Dolfing, J., 1988. Acetogenesis. in: A.J.B. Zehnder (Ed.) *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley and Sons, E.U.A., págs. 417-468.
- Driessen, W., Yspeert, P., 1999. Anaerobic treatment of low, medium and high strength effluent in the agro-industry. *Water Science and Technology*, 40, 221-228.
- Duarte, A.C., Oliveira, F.M.M., 1984. Laboratory study of dairy effluent treatment by the rotating biological disc system. *Environmental Technology Letters*, 5, 283-288.
- EEA, 2008. Maximising the environmental benefits of Europe's bioenergy potential. Technical report n° 10. Acedido a 13/08/2009. Disponível em: <http://www.eea.europa.eu/themes/energy>.
- Elefsiniotis, P., Oldham, W.K., 1994. Substrate degradation patterns in acid-phase anaerobic digestion of municipal primary sludge. *Environmental Technology*, 15, 741-751.
- Erguder, T.H., Tezel, U., Guven, E., Demirel, G.N., 2001. Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *Waste Management*, 21, 643-650.
- Euroserv'ER, 2008. Biogas barometer. *Systèmes Solaires - Le Journal Des Énergies Renouvelables*, n° 186. Acedido a 17/08/2009. Disponível em: <http://www.euroserv-er.org/>.
- Fang, H.H.P., 1991. Treatment of wastewater from a whey processing plant using activated-sludge and anaerobic processes. *Journal of Dairy Science*, 74, 2015-2019.
- Fang, H.H.P., Chui, H.K., 1993. Maximum COD loading capacity in UASB reactors at 37 °C. *Journal of Environmental Engineering-Asce*, 119, 103-119.
- Fang, H.H.P., Chui, H.K., 1994. Comparison of startup performance of 4 anaerobic reactors for the treatment of high-strength wastewater. *Resources Conservation and Recycling*, 11, 123-138.
- Fang, H.H.P., Chui, H.K., Li, Y.Y., Chen, T., 1994. Performance and granule characteristics of UASB process treating wastewater with hydrolyzed proteins. *Water Science and Technology*, 30, 55-63.
- Fang, H.H.P., Liu, Y., 2001. Anaerobic wastewater treatment in (sub-)tropical regions. in: T. Matsuo, K. Hanaki, S. Takizawa, H. Satoh (Eds.), *Advances in water and wastewater treatment technology*. Elsevier, Amsterdão, Holanda., págs. 285-294.
- Fang, H.H.P., Yu, H.Q., 2001. Acidification of lactose in wastewater. *Journal of Environmental Engineering-Asce*, 127, 825-831.
- Fang, H.H.P., Zhang, T., Liu, H., 2002. Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 112-118.
- Farrell, A.E., Gopal, A.R., 2008. Bioenergy research needs for heat, electricity, and liquid fuels. *Mrs Bulletin*, 33, 373-380.

- Ferchichi, M., Crabbe, E., Gil, G.H., Hintz, W., Almadidy, A., 2005. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *Journal of Biotechnology*, 120, 402-409.
- Fergala, M.A.A., Sayed, S.K.I., 1995. Two-stage UASB concept for treatment of domestic sewage including sludge stabilization process. *Water Science and Technology*, 32, 55-63.
- Fernandez, A.S., Hashsham, S.A., Dollhopf, S.L., Raskin, L., Glagoleva, O., Dazzo, F.B., Hickey, R.F., Criddle, C.S., Tiedje, J.M., 2000. Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4058-4067.
- Filho, B.C., Figueiredo, R.F., Nour, E.A.A., 1996. Anaerobic pretreatment of dairy liquid effluents. 51^a Purdue Industrial Waste Conference Proceedings, págs. 323-331.
- Francese, A., Cordoba, P., Duran, J., Sineriz, F., 1998. High upflow velocity and organic loading rate improve granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 337-341.
- Fu, W.G., Mathews, A.P., 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*, 3, 163-170.
- Fuzzato, M.C., Adorno, M.A.T., de Pinho, S.C., Ribeiro, R., Tommaso, G., 2009. Simplified mathematical model for an anaerobic sequencing batch biofilm reactor treating lipid-rich wastewater subject to rising organic loading rates. *Environmental Engineering Science*, 26, 1197-1206.
- Gallert, C., Bauer, S., Winter, J., 1998. Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 495-501.
- Garcia, J.-L., Patel, B.K.C., Ollivier, B., 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*, 6, 205-226.
- Garcia, P.A., Rico, J.L., Fdzpolanco, F., 1991. Anaerobic treatment of cheese whey in a 2-phase UASB reactor. *Environmental Technology*, 12, 355-362.
- Gavala, H.N., Kopsinis, H., Skiadas, I.V., Stamatelatou, K., Lyberatos, G., 1999. Treatment of dairy wastewater using an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 73, 59-63.
- Gerardi, M.H., 2003. The microbiology of anaerobic digesters. Wiley InterScience, E.U.A.
- Ghaly, A.E., Ramkumar, D.R., Sadaka, S.S., Rochon, J.D., 2000. Effect of reseeded and pH control on the performance of a two-stage mesophilic anaerobic digester operating on acid cheese whey. *Canadian Agricultural Engineering*, 42, 173-183.
- Gomes, A., Pintado, M., Malcata, X., 2008. Conhecer a importância do leite na nutrição humana Leite I+D+T. Associação Nacional dos Industriais de Laticínios, págs. 2-4.
- Goodwin, J.A.S., Wase, D.A.J., Forster, C.F., 1990. Anaerobic digestion of ice-cream wastewaters using the UASB process. *Biological Wastes*, 32, 125-144.
- Grabowski, A., Blanchet, D., Jeanthon, C., 2005. Characterization of long-chain fatty-acid-degrading syntrophic associations from a biodegraded oil reservoir. *Research in Microbiology*, 156, 814-821.
- Grimont, P.A., Grimont, F., 2002a. Genus XII. Enterobacter. in: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag, Nova Iorque, E.U.A., págs. 661-669.
- Grimont, P.A., Grimont, F., 2002b. Genus XVI. Klebsiella. in: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag, Nova Iorque, E.U.A., págs. 685-693.
- Grotenhuis, J.T.C., Smit, M., Plugge, C.M., Xu, Y.S., Vanlammeren, A.A.M., Stams, A.J.M., Zehnder, A.J.B., 1991. Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1942-1949.
- Guerrero, L., Omil, F., Mendez, R., Lema, J.M., 1999. Anaerobic hydrolysis and acidogenesis of wastewaters from food industries with high content of organic solids and protein. *Water Research*, 33, 3281-3290.
- Guiot, S.R., Pauss, A., Costerton, J.W., 1991. A structured model of the anaerobic granule consortium. *Water Science and Technology*, 25, 1-10.
- Gujer, W., Zehnder, A.J.B., 1983. Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 15, 127-167.

- Gunnerson, C.H., Stuckey, D.C., 1986. Anaerobic digestion: principles and practices for biogas systems. The World Bank, Washington, E.U.A.
- Gutiérrez, J.L.R., Encina, P.A.G., Fdz-Polanco, F., 1991. Anaerobic treatment of cheese-production wastewater using a UASB reactor. *Bioresource Technology*, 37, 271-276.
- Hanaki, K., Matsuo, T., Nagase, M., 1981. Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 1591-1610.
- Haridas, A., Suresh, S., Chitra, K.R., Manilal, V.B., 2005. The Buoyant Filter Bioreactor: a high-rate anaerobic reactor for complex wastewater - process dynamics with dairy effluent. *Water Research*, 39, 993-1004.
- Hartmann, H., Ahring, B.K., 2005. The Future of Biogas Production. Risø International Energy Conference 2005, Risø, Dinamarca.
- Hatamoto, M., Imachi, H., Fukayo, S., Ohashi, A., Harada, H., 2007c. *Syntrophomonas palmitatica* sp nov., an anaerobic, syntrophic, long-chain fatty-acid-oxidizing bacterium isolated from methanogenic sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2137-2142.
- Hatamoto, M., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., 2007a. Identification and cultivation of anaerobic, syntrophic long-chain fatty acid-degrading microbes from mesophilic and thermophilic methanogenic sludges. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1332-1340.
- Hatamoto, M., Imachi, H., Yashiro, Y., Ohashi, A., Harada, H., 2007b. Diversity of anaerobic microorganisms involved in long-chain fatty acid degradation in methanogenic sludges as revealed by RNA-based stable isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4119-4127.
- Hattori, S., 2008. Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes and Environments*, 23, 118-127.
- Hawkes, F.R., Donnelly, T., Eerson, G.K., 1995. Comparative performance of anaerobic digesters operating on ice-cream wastewater. *Water Research*, 29, 525-533.
- Henze, M., 1997. Anaerobic wastewater treatment. in: M. Henze, P. Harremoës, J.C.J. Jansen, E. Arvin (Eds.), *Wastewater treatment - Biological and chemical processes*. Springer, Alemanha, págs. 285-310.
- Hernandez-Eugenio, G., Fardeau, M.-L., Patel, B.t.K.C., Macarie, H., Garcia, J.-L., Ollivier, B., 2000. *Desulfovibrio mexicanus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating cheese wastewaters. *Anaerobe*, 6, 305-312.
- Hespell, R.B., Canale-Parola, E., 1973. Glucose and pyruvate metabolism of *Spirochaeta litoralis*, an anaerobic marine Spirochete. *Journal of Bacteriology*, 116, 931-937.
- Himebaugh, R.R., Smith, M.J., 1979. Semi-Micro tube method for chemical oxygen demand. *Analytical Chemistry*, 51, 1085.
- Himmi, E.H., Bories, A., Boussaid, A., Hassani, L., 2000. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermanii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 435-440.
- Holm-Nielsen, J.B., Al Seadi, T., Oleskowicz-Popiel, P., 2009. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresource Technology*, 100, 5478-5484.
- Hu, W.C., Thayanithy, K., Forster, C.F., 2002. A kinetic study of the anaerobic digestion of ice-cream wastewater. *Process Biochemistry*, 37, 965-971.
- Hungate, R.E., 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, Londres.
- Hwang, S.H., Hansen, C.L., Stevens, D.K., 1992. Biokinetics of an upflow anaerobic sludge blanket reactor treating whey permeate. *Bioresource Technology*, 41, 223-230.
- Hwu, C.S., 1997. Enhancing anaerobic treatment of wastewater containing oleic acid. Tese de doutoramento. Wageningen University, Holanda.
- Hwu, C.S., Tseng, S.K., Yuan, C.Y., Kulik, Z., Lettinga, G., 1998. Biosorption of long-chain fatty acids in uasb treatment process. *Water Research*, 32, 1571-1579.
- Imhoff, J.F., Hiraishi, A., Süling, J., 2002. Anoxygenic phototrophic purple bacteria. in: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag, Nova Iorque, E.U.A., págs. 119-132.
- Instituto Nacional de Estatística (INE), 2008. Estatísticas agrícolas 2007, Lisboa.
- Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial (INETI) e Instituto de Materiais e Tecnologias de Produção (IMP), 2001. Guia técnico - Indústria dos laticínios, Lisboa, págs. 49-61.

- Iyer, P., Bruns, M.A., Zhang, H., Van Ginkel, S., Logan, B.E., 2004. H₂-Producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculum. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 166-173.
- Janssen, P.H., Morgan, H.W., 1992. Glucose catabolism by *Spirochaeta thermophila* RI 19.B1. *Journal of Bacteriology*, 174, 2449-2453.
- Jarvis, G.N., Strompl, C., Moore, E.R.B., Thiele, J.H., 1998. Isolation and characterisation of obligately anaerobic, lipolytic bacteria from the rumen of red deer. *Systematic and Applied Microbiology*, 21, 135-143.
- Jarvis, G.N., Strompl, C., Moore, E.R.B., Thiele, J.H., 1999. Isolation and characterization of two glycerol-fermenting clostridial strains from a pilot scale anaerobic digester treating high lipid-content slaughterhouse waste. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 412-420.
- Jean-Luc, A., Bernard, C., Georges, D., 2003. Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. *Lait*, 83, 417-438.
- Jedrzejska-Cicinska, M., Kozak, K., Krzemieniewski, M., 2007. A comparison of the technological effectiveness of dairy wastewater treatment in anaerobic UASB reactor and anaerobic reactor with an innovative design. *Environmental Technology*, 28, 1127-1133.
- Jensen, R.G., Newburg, D.S., 1995. B. Bovine milk lipids. in: R.G. Jensen (Ed.) Handbook of milk composition. Academic Press, E.U.A.
- Jeris, J.S., McCarty, P.L., 1965. The biochemistry of methane fermentation using C¹⁴ tracers *Journal Water Pollution Control Federation*, 37, 178-192.
- Juillard, V., Laan, H., Kunji, E.R.S., Jeronimus-Stratingh, C.M., Bruins, A.P., Konings, W.N., 1995. The extracellular P(I)-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *Journal of Bacteriology*, 177, 3472-3478.
- Kalyuzhnyi, S.V., Martinez, E.P., Martinez, J.R., 1997. Anaerobic treatment of high-strength cheese-whey wastewaters in laboratory and pilot UASB-reactors. *Bioresource Technology*, 60, 59-65.
- Kasapgil, B., Eerson, G.K., Ince, O., 1994. An investigation into the pretreatment of dairy wastewater prior to aerobic biological treatment. *Water Science and Technology*, 29, 205-212.
- Kaspar, H.F., Wuhmann, K., 1978. Product inhibition in sludge digestion. *Microbial Ecology*, 4, 241-248.
- Ke, S.Z., Shi, Z., Fang, H.H.P., 2005. Applications of two-phase anaerobic degradation in industrial wastewater treatment. *International Journal of Environment and Pollution*, 23, 65-80.
- Kennedy, K.J., Guiot, S.R., 1986. Anaerobic upflow bed filter, development and applications. *Water Science and Technology*, 18, 71-86.
- Kobayashi, T., Li, Y.Y., Harada, H., 2008. Analysis of microbial community structure and diversity in the thermophilic anaerobic digestion of waste activated sludge. *Water Science and Technology*, 57, 1199-1205.
- Koster, I.W., Cramer, A., 1987. Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long-chain fatty-acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 403-409.
- Krause, L., Diaz, N.N., Edwards, R.A., Gartemann, K.-H., Krömeke, H., Neuweiger, H., Pühler, A., Runte, K.J., Schlüter, A., Stoye, J., Szczepanowski, R., Tauch, A., Goesmann, A., 2008. Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *Journal of Biotechnology*, 136, 91-101.
- Kuever, J., Rainey, F.A., Widdel, F., 2002. Genus I. Desulfovibrio. in: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag, Nova Iorque, E.U.A., págs. 926-938.
- Kugelman, I.J., Chin, K.K., 1971. Toxicity, synergism, and antagonism in anaerobic waste treatment processes. in: R.F. Gould (Ed.) *Anaerobic biological treatment processes*. American Chemical Society, Washington, E.U.A.
- Kyazze, G., Dinsdale, R., Guwy, A.J., Hawkes, F.R., Premier, G.C., Hawkes, D.L., 2007. Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 759-770.
- Lalman, J., Bagley, D.M., 2002. Effects of C18 long chain fatty acids on glucose, butyrate and hydrogen degradation. *Water Research*, 36, 3307-3313.
- Lalman, J.A., Komjarova, I., Jing, N., 2004. Lactose fermentation in the presence of C18 fatty acids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 1259-1267.

- Lawrence, A.W., McCarty, P.L., 1969. Kinetics of methane fermentation in anaerobic treatment. *Journal Water Pollution Control Federation*, 41, R1-and.
- Leal, M.C.M.R., Freire, D.M.G., Cammarota, M.C., Sant'Anna Jr., G.L., 2006. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. *Process Biochemistry*, 41, 1173-1178.
- LeBlanc, D.J., Crow, V.L., Lee, L.N., Garon, C.F., 1979. Influence of the lactose plasmid on the metabolism of galactose by *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 137, 878-884.
- Lee, S.Y., Yang, K.Y., Hwang, S.H., 2004. Use of response surface analysis in selective bioconversion of starch wastewater to acetic acid using a mixed culture of anaerobes. *Process Biochemistry*, 39, 1131-1135.
- Lettinga, G., 2001. Digestion and degradation, air for life. *Water Science and Technology*, 44, 157-176.
- Lettinga, G., Hulshoff-Pol, L.W., 1991. UASB process design for various types of wastewaters. *Water Science and Technology*, 24, 87-107.
- Lettinga, G., Vanvelsen, A.F.M., Hobma, S.W., Dezeeuw, W., Klapwijk, A., 1980. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater-treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 699-734.
- Li, A., Sutton, P.M., 1983. Determination of alkalinity requirements for the anaerobic treatment processes 38th Annual Purdue Industrial Waste Conference, West Lafayette, Indiana, E.U.A..
- Li, T.L., Mazeas, L., Sghir, A., Leblon, G., Bouchez, T., 2009. Insights into networks of functional microbes catalysing methanization of cellulose under mesophilic conditions. *Environmental Microbiology*, 11, 889-904.
- Lin, C.Y., Chang, R.C., 1999. Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74, 498-500.
- Liu, Y.T., Balkwill, D.L., Aldrich, H.C., Drake, G.R., Boone, D.R., 1999. Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 545-556.
- Lorowitz, W.H., Zhao, H., Bryant, M.P., 1989. *Syntrophomonas wolfei* subsp. *saponavida* subsp. nov., a long-chain fatty-acid-degrading, anaerobic, syntrophic bacterium; *Syntrophomonas wolfei* subsp. *wolfei* subsp. nov.; and emended descriptions of the genus and species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 122-126.
- Lorowitz, W.H., Zhao, H.X., Bryant, M.P., 1989. *Syntrophomonas wolfei* subsp. *saponavida* subsp. nov., a long-chain fatty acid degrading, anaerobic, syntrophic bacterium - *Syntrophomonas wolfei* subsp. *wolfei* subsp. nov. - and emended description of the genus and species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 122-126.
- Lowe, S.E., Mahendra, K.J., Zeikus, J.G., 1993. Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. *Microbiological Reviews*, 57, 451-509.
- Lun, S.-Y., Wu, J., Jian, C., 1995. Anaerobic waste treatment: Efficient separation of the acid and methane forming phases using two UASB Reactors. *Process Biochemistry*, 30, 523-529.
- Luostarinen, S.A., Rintala, J.A., 2005. Anaerobic on-site treatment of black water and dairy parlour wastewater in UASB-septic tanks at low temperatures. *Water Research*, 39, 436-448.
- MacLeod, F.A., Guiot, S.R., Costerton, J.W., 1995. Electron microscopic examination of the extracellular polymeric substances in anaerobic granular biofilms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 481-485.
- Mah, R.A., Smith, M.R., Baresi, L., 1978. Studies on an acetate-fermenting strain of *Methanosarcina*. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 1174-1184.
- Mahoney, E.M., Varangu, L.K., Cairns, W.L., Kosaric, N., Murray, R.G.E., 1987. The effect of calcium on microbial aggregation during UASB start-up. *Water Science and Technology*, 19, 249-260.
- Martínez-Campos, R., de la Torre, M., 2002. Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose. *Biotechnology Letters*, 24, 427-431.
- Masse, L., Massé, D.I., Kennedy, K.J., 2003. Effect of hydrolysis pretreatment on fat degradation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. *Process Biochemistry*, 38, 1365-1372.

- McCarty, P.L., 2001. The development of anaerobic treatment and its future. *Water Science and Technology*, 44, 149-156.
- McCarty, P.L., McKinney, R.E., 1961. Volatile acid toxicity in anaerobic digestion. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 33, 223.
- McInerney, M.J., 1988. Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. in: A.J.B. Zehnder (Ed.) *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley and Sons, Inc., E.U.A., págs. 373-415.
- McInerney, M.J., Bryant, M.P., Pfennig, N., 1979. Anaerobic bacterium that degrades fatty-acids in syntrophic association with methanogens. *Archives of Microbiology*, 122, 129-135.
- McInerney, M.J., Struchtemeyer, C.G., Sieber, J., Mouttaki, H., Stams, A.J.M., Schink, B., Rohlin, L., Gunsalus, R.P., 2008. Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125, 58-72.
- McMahon, K.D., Martin, H.G., Hugenholtz, P., 2007. Integrating ecology into biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 287-292.
- Monroy, O., Vazquez, F., Derramadero, J.C., Guyot, J.P., 1995. Anaerobic-aerobic treatment of cheese wastewater with national technology in Mexico: The case of "El Sauz". *Water Science and Technology*, 32, 149-156.
- Morvai, L., Mihaltz, P., Czako, L., Peterfy, M., Hollo, J., 1990. The influence of organic load on granular sludge development in an acetate-fed system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33, 463-468.
- Murray, R.G.E., Doetsch, R.N., Robinow, C.F., 1994. Determinative and cytological light microscopy. in: P. Gerhart, R.G.E. Murray, W.A. Wood, N.R. Krieg (Eds.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society of Microbiology, Washington, E.U.A., págs. 24-39.
- Nadais, H., Capela, I., Arroja, L., Duarte, A., 2001. Kinetic analysis of anaerobic degradation of dairy wastewater Proc. of the 9th World Congress on Anaerobic Digestion – 2001, Antwerp, Belgium, págs. 203-208.
- Nadais, H., Capela, I., Arroja, L., 2006. Intermittent vs continuous operation of upflow anaerobic sludge bed reactors for dairy wastewater and related microbial changes. *Water Science and Technology*, 54, 103-109.
- Nadais, H., Capela, I., Arroja, L., Duarte, A., 2005. Optimum cycle time for intermittent UASB reactors treating dairy wastewater. *Water Research*, 39, 1511-1518.
- Nadais, M.H., 2002. Tratamento de efluentes de indústrias de laticínios em reatores UASB com funcionamento intermitente. Tese de doutoramento. Departamento de Ambiente e Ordenamento. Universidade de Aveiro, Aveiro.
- Nanninga, H.J., Drent, W.J., Gottschal, J.C., 1987. Fermentation of glutamate by *Selenomonas acidaminophila* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 147, 152-157.
- Neal, C.o., 2001. Alkalinity measurements within natural waters: towards a steardised approach. *The Science of The Total Environment*, 265, 99-113.
- Newburg, D.S., Neubauer, S.H., 1995. Carbohydrates in milks: analysis, quantities and significance. in: R.G. Jensen (Ed.) *Handbook of milk composition*. Academic Press, E.U.A.
- O'Leary, V.S., Woychik, J.H., 1976. Utilization of lactose, glucose and galactose by a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk treated with lactase enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 32, 89-94.
- Omil, F., Garrido, J.M., Arrojo, B., Mendez, R., 2003. Anaerobic filter reactor performance for the treatment of complex dairy wastewater at industrial scale. *Water Research*, 37, 4099-4108.
- Oremle, R.S., 1988. Biogeochemistry of methanogenic bacteria. in: A.J.B. Zehnder (Ed.) *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley and Sons, E.U.A., págs. 641-706.
- Öztürk, I., Eroglu, V., Ubay, G., Demir, I., 1993. Hybrid upflow anaerobic sludge blanket reactor (HUASBR) treatment of dairy effluents. *Water Science and Technology*, 28, 77-85.
- Parawira, W., Murto, M., Read, J.S., Mattiasson, B., 2005. Profile of hydrolases and biogas production during two-stage mesophilic anaerobic digestion of solid potato waste. *Process Biochemistry*, 40, 2945-2952.
- Park, W., Hyun, S.-H., Kim, T.-H., Kim, I., 2009. Quantitative analysis of the trophic groups with a fluorescence in situ hybridization (FISH) and the competitive kinetics of a propionate enriched anaerobic culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 523-530.

- Parkin, G.F., Owen, W.F., 1986. Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludge. *Journal of Environmental Engineering*, 112, 867-920.
- Passeggi, M., López, I., Borzacconi, L., 2009. Integrated anaerobic treatment of dairy industrial wastewater and sludge. *Water Science and Technology*, 59, 501-506.
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gomez, E., 1991. Kinetics of anaerobic treatment. *Water Science and Technology*, 24, 35-59.
- Pavlostathis, S.G., Gossett, J.M., 1986. A kinetic model for anaerobic digestion of biological sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 1519-1530.
- Pereira, M.A., Roest, K., Stams, A.J.M., Mota, M., Alves, M., Akkermans, A.D.L., 2002. Molecular monitoring of microbial diversity in exped granular sludge bed (EGSB) reactors treating oleic acid. *FEMS Microbiology Ecology*, 41, 95-103.
- Perle, M., Kimchie, S., Shelef, G., 1995. Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy waste-water. *Water Research*, 29, 1549-1554.
- Petruy, R., Lettinga, G., 1997. Digestion of a milk-fat emulsion. *Bioresource Technology*, 61, 141-149.
- Poolman, B., Smid, E.J., Veldkamp, H., Konings, W.N., 1987. Bioenergetic consequences of lactose starvation for continuously cultured *Streptococcus cremoris*. *Journal of Bacteriology*, 169, 1460-1468.
- Regional Activity Centre for Cleaner Production (RAC/CP), 2002. Prevention of pollution in the dairy industry, Barcelona, Espanha.
- Rajeshkumar, K., Jayacheran, K., 2004. Treatment of dairy wastewater using a selected bacterial isolate, *Alcaligenes* sp. MMRR7. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118, 65-72.
- Rajeshwari, K.V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K., Kishore, V.V.N., 2000. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4, 135-156.
- Ramakrishnan, A., Gupta, S.K., 2008. Effect of effluent recycling and shock loading on the biodegradation of complex phenolic mixture in hybrid UASB reactors. *Bioresource Technology*, 99, 3745-3753.
- Ramasamy, E.V., Gajalakshmi, S., Sanjeevi, R., Jithesh, M.N., Abbasi, S.A., 2004. Feasibility studies on the treatment of dairy wastewaters with upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Bioresource Technology*, 93, 209-212.
- Ramsay, I.R., Pullammanappallil, P.C., 2001. Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. *Biodegradation*, 12, 247-256.
- Rincon, B., Raposo, F., Borja, R., Gonzalez, J.M., Portillo, M.C., Saiz-Jimenez, C., 2006. Performance and microbial communities of a continuous stirred tank anaerobic reactor treating two-phases olive mill solid wastes at low organic loading rates. *Journal of Biotechnology*, 121, 534-543.
- Rinzema, A., Boone, M., Vanknippenberg, K., Lettinga, G., 1994. Bactericidal effect of long chain fatty-acids in anaerobic digestion. *Water Environment Research*, 66, 40-49.
- Rinzema, A., Vanveen, H., Lettinga, G., 1993. Anaerobic-digestion of triglyceride emulsions in exped granular sludge bed reactors with modified sludge separators. *Environmental Technology*, 14, 423-432.
- Rogosa, M., 1971. Transfer of *Veillonella prévot* and *Acidaminococcus rogosa* from Neisseriaceae to Veillonellaceae fam. nov., and the inclusion of *Megasphaera rogosa* in Veillonellaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 21, 231-233.
- Roy, F., Samain, E., Dubourguier, H.C., Albagnac, G., 1986. *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long-chain fatty acids. *Archives of Microbiology*, 145, 142-147.
- Rozej, A., Montusiewicz, A., Lebiocka, M., 2008. Characteristics of microbial communities in biomethanization processes. *Archives of Environmental Protection*, 34, 299-307.
- Ruzicka, M., 1996. The effect of hydrogen on acidogenic glucose cleavage. *Water Research*, 30, 2447-2451.
- Saléh, B.B., Campos, C.M.M., de Figueiredo, J.G., 2009. Survey of kinetic parameters measured in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) in pilot-scale treatment of dairy wastewater. *Acta Scientiarum-Technology*, 31, 51-56.
- Samson, R., van den Berg, B., Peters, R., Hade, C., 1985. Dairy waste treatment using industrial-scale fixed-film and upflow sludge bed anaerobic digesters: design and start-up experience. *Proceedings of the Industrial Wastewater Conference*, págs. 235-241.

- Samsoon, P., Loewenthal, R.E., Wentzel, M.C., Moosbrugger, R.E., Marais, G.R., 1991. Effects of a recycle in upflow anaerobic sludge bed (UASB) systems. *Water SA*, 17, 37-46.
- Sawayama, S., Hanada, S., Kamagata, Y., 2000. Isolation and characterization of phototrophic bacteria growing in lighted upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89, 396-399.
- Schauder, R., Schink, B., 1989. *Anaerovibrio-glycerini* sp.nov, an anaerobic bacterium fermenting glycerol to propionate, cell matter, and hydrogen. *Archives of Microbiology*, 152, 473-478.
- Schink, B., 1988. Principles e limits of anaerobic degradation: environmental and technological aspects. in: A.J.B. Zehnder (Ed.) *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley and Sons, E.U.A., págs. 771-846.
- Schink, B., 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 262-280.
- Schink, B., 2000. Syntrophism among Prokaryotes. in: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, Nova Iorque, E.U.A., págs. 276-299.
- Schmidt, J.E., Ahring, B.K., 1996. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 229-246.
- Schneider, I., Topalova, Y., 2009. Structural and functional changes in river microbial communities after dairy wastewater discharge. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23, 1210-1216.
- Schroder, E.W., Dehaast, J., 1989. Anaerobic-digestion of deproteinated cheese whey in an upflow sludge blanket reactor. *Journal of Dairy Research*, 56, 129-139.
- Seagren, E.A., Levine, A.D., Dague, R.R., 1991. High pH effects in anaerobic treatment of liquid industrial by-products 45^a Purdue Industrial Waste Conference Proceedings. Lewis Publishers, págs. 377-386.
- Seghezzo, L., Zeeman, G., van Lier, J.B., Hamelers, H.V.M., Lettinga, G., 1998. A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology*, 65, 175-190.
- Shigematsu, T., Tang, Y., Mizuno, Y., Kawaguchi, H., Morimura, S., Kida, K., 2006. Microbial diversity of mesophilic methanogenic consortium that can degrade long-chain fatty acids in chemostat cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102, 535-544.
- Shin, H.S., Paik, B.C., 1990. Improved performance of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors by operating alternatives. *Biotechnology Letters*, 12, 469-474.
- Singh, R.P., Kumar, S., Ojha, C.S.P., 1998. A critique on operational strategies for start-up of UASB reactors: effects of sludge loading rate and seed/biomass concentration. *Biochemical Engineering Journal*, 1, 107-119.
- Siriwongrungson, V., Zeny, R.J., Angelidaki, I., 2007. Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. *Water Research*, 41, 4204-4210.
- Skoog, D.A., Holler, E.J., Nieman, T.A., 1998. Principles of instrumental analysis. 5th ed. Harcourt Brace & Company, United States of America.
- Sommer, S., Petersen, S., Sørensen, P., Poulsen, H., Møller, H., 2007. Methane and carbon dioxide emissions and nitrogen turnover during liquid manure storage. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 78, 27-36.
- Song, L., Dongi, X.Z., 2008. *Clostridium amylolyticum* sp nov., isolated from H₂-producing UASB granules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2132-2135.
- Sørensen, A.H., Winther-Nielsen, M., Ahring, B.K., 1991. Kinetics of lactate, acetate and propionate in unadapted and lactate-adapted thermophilic, anaerobic sewage sludge: the influence of sludge adaptation for start-up of thermophilic UASB-reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 823-827.
- Sousa, D.Z., Pereira, M.A., Smidt, H., Stams, A.J.M., Alves, M.M., 2007c. Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Ecology*, 60, 252-265.
- Sousa, D.Z., Smidt, H., Alves, M.M., Stams, A.J.M., 2007b. *Syntrophomonas zehnderi* sp nov., an anaerobe that degrades long-chain fatty acids in co-culture with *Methanobacterium formicicum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 609-615.

- Sousa, D.Z., Pereira, M.A., Stams, A.J.M., Alves, M.M., Smidt, H., 2007a. Microbial communities involved in anaerobic degradation of unsaturated or saturated long-chain fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1054-1064.
- Souto, T., Aquino, S., Silva, S., Chernicharo, C., 2009. Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. *Biodegradation* (In Press).
- Stackebret, E., Schumann, P., Schuler, E., Hippe, H., 2003. Reclassification of *Desulfotomaculum auripigmentum* as *Desulfosporosinus auripigmenti* corrig., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 53, 1439-1443.
- Stams, A.J.M., 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 66, 271-294.
- Strydom, J.P., Mostert, J.F., 1997. Two-phase anaerobic digestion of three different dairy effluents using a hybrid bioreactor. *Water SA*, 23, 151-156.
- Svetlitsnyi, V., Rainey, F., Wiegel, J., 1996. *Thermosyntropho lipolytica* gen nov, sp nov, a lipolytic, anaerobic, alkalitolerant, thermophilic bacterium utilizing short- and long-chain fatty acids in syntrophic coculture with a methanogenic archaeum. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 1131-1137.
- Talabardon, M., Schwitzguebel, J.P., Peringer, P., 2000. Anaerobic thermophilic fermentation for acetic acid production from milk permeate. *Journal of Biotechnology*, 76, 83-92.
- Talbot, G., Topp, E., Palin, M.F., Masse, D.I., 2008. Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Research*, 42, 513-537.
- Tang, Y.Q., Shigematsu, T., Morimura, S., Kida, K., 2005. Microbial community analysis of mesophilic anaerobic protein degradation process using bovine serum albumin (BSA)-fed continuous cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 150-164.
- Tawfik, A., Sobhey, M., Badawy, M., 2008. Treatment of a combined dairy and domestic wastewater in an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor followed by activated sludge (AS system). *Desalination*, 227, 167-177.
- Tay, J.H., Yan, Y.G., 1996. Influence of substrate concentration on microbial selection and granulation during start-up of upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Environment Research*, 68, 1140-1150.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D., 2003. Wastewater engineering. 4^a ed. McGraw Hill, Nova Iorque, E.U.A.
- Temudo, M.F., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M., 2007. Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: A chemostat study. *Biotechnology and Bioengineering*, 98, 69-79.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K., 1977. Energy-conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41, 100-180.
- Thomas, T.D., Ellwood, D.C., Longyear, V.M.C., 1979. Change from homo- to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. *Journal of Bacteriology*, 138, 109-117.
- Thomson, C.A., Delaquis, P.J., Mazza, G., 1999. Detection and measurement of microbial lipase activity: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 165-187.
- United Nations Environment Program (UNEP), 2000. Cleaner production assessment in dairy processing, Paris, França.
- Van den Berg, L., Kennedy, K.J., 1983. Dairy wastewater treatment with anaerobic stationary fixed film reactors. *Water Science and Technology*, 15, 359-368.
- Veenheuvel, J.C., Beftink, H.H., Verschuren, P.G., 1988. Inhibition of the acidogenic dissimilation of glucose in anaerobic continuous cultures by free butyric acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 89-94.
- Vartoukian, S.R., Palmer, R.M., Wade, W.G., 2007. The division "Synergistes". *Anaerobe*, 13, 99-106.
- Vavilin, V.A., Rytow, S.V., Lokshina, L.Y., 1995. Modelling hydrogen partial pressure change as a result of competition between the butyric and propionic groups of acidogenic bacteria. *Bioresource Technology*, 54, 171-177.
- Vidal, G., Carvalho, A., Méndez, R., Lema, J.M., 2000. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresource Technology*, 74, 231-239.

- Vlyssides, A., Barampouti, E.M., Mai, S., 2009. Influence of ferrous iron on the granularity of a UASB reactor. *Chemical Engineering Journal*, 146, 49-56.
- Vogels, G.D., Keltjens, J.T., 1988. Biochemistry of methane production. in: A.J.B. Zehnder (Ed.) *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley and Sons, E.U.A., págs. 707-770.
- Voolapalli, R.K., Stuckey, D.C., 2001. Hydrogen production in anaerobic reactors during shock loads--influence of formate production and H₂ kinetics. *Water Research*, 35, 1831-1841.
- Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L., 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, 99, 7928-7940.
- Whitman, W.B., Bowen, T.L., Boone, D.R., 2000. The methanogenic bacteria. in: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer (Eds.), *The Procarriotes*. Springer-Verlag, Nova Iorque, E.U.A., págs. 719-767.
- Wiesmann, U., Choi, I.S., Dombrowski, E.-M., 2007. *Fundamentals of biological wastewater treatment*. Wiley-VCH, Alemanha.
- Winter, J., Wolfe, R.S., 1979. Complete degradation of carbohydrate to carbon dioxide and methane by syntrophic cultures of *Acetobacterium woodii* and *Methanosarcina barkeri*. *Archives of Microbiology*, 121, 97-102.
- Wu, S.Y., Hung, C.H., Lin, C.Y., Lin, P.J., Lee, K.S., Lin, C.N., Chang, F.Y., Chang, J.S., 2008. HRT-dependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludge systems using glucose as the carbon substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1542-1549.
- Wu, W.M., Jain, M.K., Zeikus, J.G., 1996. Formation of fatty acid-degrading, anaerobic granules by defined species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2037-2044.
- Yamada, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y., 2006. *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes Anaerolineae classis nov. and Caldilineae classis nov. in the bacterial phylum Chloroflexi. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 56, 1331-1340.
- Yan, J.Q., Lo, K.V., Liao, P.H., 1989. Anaerobic-digestion of cheese whey using up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Biological Wastes*, 27, 289-305.
- Yu, H.Q., Fang, H.H.P., 2000. Thermophilic acidification of dairy wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 439-444.
- Yu, H.Q., Fang, H.H.P., 2001. Acidification of mid- and high-strength dairy wastewaters. *Water Research*, 35, 3697-3705.
- Yu, H.Q., Fang, H.H.P., 2001. Production of volatile fatty acids and alcohols from dairy wastewater under thermophilic conditions. *Transactions of the Asae*, 44, 1357-1361.
- Yu, H.Q., Fang, H.H.P., 2002. Acidogenesis of dairy wastewater at various pH levels. *Water Science and Technology*, 45, 201-206.
- Yu, H.Q., Fang, H.H.P., Gu, G.W., 2002. Comparative performance of mesophilic and thermophilic acidogenic upflow reactors. *Process Biochemistry*, 38, 447-454.
- Zeeman, G., Seers, W.T.M., Wang, K.Y., Lettinga, G., 1997. Anaerobic treatment of complex wastewater and waste activated sludge - Application of an upflow anaerobic solid removal (UASR) reactor for the removal and pre-hydrolysis of suspended cod. *Water Science and Technology*, 35, 121-128.
- Zellner, G., Macario, A.J.L., Conway de Macario, E., 1997. A study of three anaerobic methanogenic bioreactors reveals that syntrophs are diverse and different from reference organisms. *FEMS Microbiology Ecology*, 22, 295-301.
- Zellner, G., Stackebret, E., Nagel, D., Messner, P., Weiss, N., Winter, J., 1996. *Anaerofilum pentosovorans* gen. nov., sp. nov., and *Anaerofilum agile* sp. nov., two new, strictly anaerobic, mesophilic, acidogenic bacteria from anaerobic bioreactors. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 871-875.
- Zhang, C.Y., Liu, X.L., Dong, X.Z., 2004. *Syntrophomonas curvata* sp nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 969-973.
- Zhang, H., Banaszak, J.E., Parameswaran, P., Alder, J., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E., 2009. Focused-pulsed sludge pre-treatment increases the bacterial diversity and relative abundance of acetoclastic methanogens in a full-scale anaerobic digester. *Water Research*, 43, 4517-4526.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Zoetemeyer, R.J., Veenheugel, J.C., Cohen, A., 1982. pH influence on acidogenic dissimilation of glucose in an anaerobic digester *Water Research*, 16, 303-311.

Anexo

Tabela 1. Bv, volume de metano , % de remoção, % de metanização e produtividade em CH₄ ao longo dos ciclos operados a cada carga

Tratamento			nº ciclo global	Bv (g CQO.L ⁻¹ .dia ⁻¹)			Volume de metano (L CH ₄ .ciclo ⁻¹)			% Remoção			% Metanização			Produtividade em CH ₄ (L CH ₄ .gCQO _r)		
Carga	nº ciclo	nº dias		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
I	1	4	1	0,93	1,00	0,88	6,58	5,85	2,72	96,00	96,00	96,84	77,81	64,26	44,84	0,31	0,25	0,13
	2	8	2	1,00	1,00	1,02	7,63	5,24	2,80	97,00	98,00	98,98	65,77	56,39	39,00	0,33	0,22	0,12
	3	12	3	0,90	0,96	1,07	5,43	4,55	1,92	95,61	99,67	100,00	66,58	49,99	25,19	0,26	0,20	0,07
II	1	16	4	2,00	1,96	2,05	11,21	9,90	7,85	99,30	98,80	98,33	59,70	54,10	20,74	0,24	0,21	0,16
	2	20	5	2,39	2,07	1,92	15,55	11,63	7,96	99,69	98,59	99,22	68,85	60,11	22,65	0,27	0,24	0,17
	3	24	6	1,78	1,78	1,69	11,70	10,70	9,00	97,66	98,41	100,00	70,92	64,36	56,16	0,28	0,25	0,22
	4	28	7	2,04	2,05	1,72	13,10	11,39	8,64	99,11	98,78	98,79	68,20	59,44	53,47	0,27	0,23	0,21
	5	32	8	1,67	1,53	1,63	12,76	8,51	10,27	97,44	98,59	99,85	82,98	59,55	66,49	0,33	0,24	0,26
	6	36	9	1,54	1,77	1,65	9,36	9,71	8,29	97,20	97,96	97,58	66,10	59,08	55,06	0,26	0,23	0,22
	7	40	10	1,59	1,66	1,84	10,59	9,38	10,01	98,29	98,76	98,61	71,32	60,30	58,04	0,28	0,24	0,23
III	1	44	11	2,82	2,76	2,75	18,55	15,85	18,05	98,81	99,76	98,89	70,27	60,79	69,74	0,28	0,24	0,28
	2	48	12	2,70	2,64	2,65	20,66	18,33	18,58	97,74	98,57	98,57	79,12	71,53	74,75	0,31	0,28	0,30
	3	52	13	2,70	2,64	2,65	17,55	16,06	17,63	97,53	99,08	99,21	74,40	64,45	67,32	0,29	0,25	0,27
IV	1	56	14	4,31	4,32	4,28	31,70	27,58	27,76	98,89	99,15	99,05	78,48	67,92	68,87	0,31	0,27	0,27
	2	60	15	4,08	4,25	4,11	30,99	28,14	30,53	98,77	98,81	98,09	81,19	70,74	79,86	0,32	0,28	0,32
	3	64	16	4,55	4,55	4,38	35,63	30,11	33,12	98,45	98,00	97,89	83,98	71,30	81,59	0,33	0,28	0,32
	4	68	17	4,35	4,44	4,27	37,76	33,15	33,61	97,91	97,84	98,73	93,56	80,50	85,20	0,37	0,32	0,34
	5	72	18	4,12	4,19	4,22	35,79	32,53	33,41	97,66	98,60	97,31	93,78	88,79	85,90	0,37	0,33	0,34
	6	76	19	4,36	4,18	4,30	38,98	33,50	34,20	97,30	98,62	98,20	91,41	85,73	85,50	0,38	0,34	0,34
	7	80	20	4,58	4,39	4,22	38,12	32,41	32,80	98,32	98,80	98,39	89,33	78,87	83,31	0,35	0,31	0,33
	8	84	21	4,36	4,36	4,40	38,61	37,33	32,90	99,05	98,89	98,66	94,45	91,46	80,01	0,37	0,36	0,32
V	1	88	22	6,26	5,93	5,89	50,51	39,31	38,51	99,09	99,04	98,89	85,99	70,63	69,82	0,34	0,28	0,28
	2	92	23	5,91	5,91	5,81	46,14	41,53	40,89	98,75	98,82	98,34	83,50	75,10	75,53	0,33	0,30	0,30
	3	96	24	6,12	5,81	5,71	43,82	44,19	41,55	98,76	98,34	98,43	76,54	81,56	77,98	0,30	0,32	0,31
	4	100	25	6,07	6,06	6,10	43,21	44,60	39,41	98,74	99,04	99,53	76,10	78,42	68,54	0,30	0,31	0,27
	5	104	26	6,07	6,07	5,84	43,73	45,98	40,17	98,64	98,85	98,88	77,14	80,92	73,42	0,30	0,32	0,29
	6	108	27	5,85	5,91	5,86	44,73	46,44	40,29	98,94	99,01	99,25	81,57	83,74	73,06	0,32	0,33	0,29

(continuação da tabela anterior)

Tratamento			nº ciclo global	Bv (g CQO.L ⁻¹ .dia ⁻¹)			Volume de metano (L CH ₄ .ciclo ⁻¹)			% Remoção			% Metanização			Produtividade em CH ₄ (L CH ₄ .gCQO _r)		
Carga	nº ciclo	nº dias		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
V	7	112	28	6,29	6,42	5,83	42,49	46,53	41,67	99,02	99,44	99,01	71,99	76,93	76,12	0,28	0,30	0,30
VI	1	116	29	7,23	7,15	6,68	54,44	60,43	51,82	98,20	98,49	96,50	80,90	90,49	84,86	0,32	0,36	0,34
	2	120	30	7,39	7,08	6,93	55,13	58,73	47,30	97,86	98,43	97,18	80,49	88,96	74,08	0,32	0,35	0,29
	3	124	31	7,73	7,57	7,57	53,35	59,89	51,63	98,67	98,39	96,80	73,86	84,84	74,33	0,29	0,34	0,29
	4	128	32	6,63	7,28	6,97	50,60	58,07	46,51	98,43	98,30	97,37	81,87	85,60	72,26	0,32	0,34	0,29
	5	132	33	6,38	6,38	7,61	57,37	52,85	51,73	97,80	98,48	96,07	97,08	88,83	74,67	0,38	0,35	0,29
	6	136	34	8,26	8,26	8,03	57,22	63,44	48,95	98,68	98,58	96,19	74,08	82,20	66,88	0,29	0,32	0,26
	7	140	35	7,63	8,37	7,65	51,59	64,86	50,00	98,61	98,39	95,68	72,32	83,13	72,08	0,29	0,33	0,28
	8	144	36	7,86	8,33	6,48	49,67	65,20	40,44	98,67	98,71	96,15	67,63	83,64	68,48	0,27	0,33	0,27
	9	148	37	7,50	7,50	6,68	51,77	58,90	44,36	98,21	98,00	95,25	74,21	84,61	73,59	0,29	0,33	0,29
	10	152	38	7,25	7,55	7,01	50,72	59,74	45,65	97,41	97,66	95,03	75,78	85,46	72,32	0,30	0,34	0,29
VII	1	156	39	10,67	10,61	10,55	73,26	75,55	67,57	97,53	97,78	93,82	74,30	76,88	72,02	0,29	0,30	0,28
	2	160	40	12,46	11,89	11,63	81,44	79,96	73,11	96,83	96,72	94,43	71,25	73,34	70,22	0,28	0,29	0,28
	3	164	41	12,01	11,55	12,58	73,15	70,06	67,06	95,23	94,03	95,69	67,47	68,04	58,78	0,27	0,27	0,23
	4	168	42	11,55	11,20	11,32	80,86	85,58	77,07	97,48	97,70	95,13	75,81	82,53	75,50	0,30	0,33	0,30
	5	172	43	11,94	12,06	11,30	73,20	80,04	73,41	98,20	98,11	95,53	65,88	71,37	72,51	0,26	0,28	0,29
	6	176	44	11,63	11,63	12,20	72,00	77,82	66,62	98,23	98,02	96,09	66,53	72,06	59,95	0,26	0,28	0,24
	7	180	45	12,55	12,42	11,03	73,44	81,95	67,45	98,14	98,31	96,18	62,94	70,84	67,12	0,25	0,28	0,27
	8	184	46	11,10	10,64	10,51	80,44	83,51	63,60	97,77	98,05	95,54	78,21	84,49	73,92	0,31	0,33	0,29
	9	188	47	11,53	11,42	10,84	75,66	81,00	70,68	98,05	98,73	96,76	70,62	75,80	71,11	0,28	0,30	0,28
	10	192	48	12,26	12,50	10,57	86,92	91,70	75,79	96,50	97,59	96,28	77,53	79,30	78,58	0,31	0,31	0,31
	11	196	49	10,77	10,77	10,97	75,92	78,94	73,18	97,41	98,66	96,29	76,38	78,42	73,09	0,30	0,31	0,29

Tabela 2.CQO_T e CQO_s no efluente de saída, % de CH₄ no biogás, e pH e alcalinidade no efluente de saída ao longo dos ciclos operados a cada carga.

Tratamento			nº ciclo global	CQO _T (g.L ⁻¹)			CQO _s (g.L ⁻¹)			% CH ₄ no biogás			pH			Alcalinidade (g CaCO ₃ .L ⁻¹)		
Carga	nº ciclo	nº dias		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
I	1	4	1	0,04	0,04	0,02	0,54	0,32	0,08	84,60	85,35	85,20	8,66	8,67	8,18	1,60	1,80	0,60
	2	8	2	0,03	0,02	0,01	0,49	0,20	0,09	85,43	85,35	87,41	8,31	8,50	8,09	2,00	1,60	0,80
	3	12	3	0,04	0,00	0,00	0,19	0,14	0,09	89,51	91,68	93,06	8,51	8,51	8,18	2,25	2,20	1,38
II	1	16	4	0,01	0,02	0,02	0,72	0,43	0,12	82,27	82,53	87,31	8,70	8,72	8,19	1,30	3,30	1,15
	2	20	5	0,01	0,03	0,01	0,55	0,47	0,12	81,23	85,65	84,63	8,35	8,48	8,24	2,15	2,05	1,03
	3	24	6	0,04	0,03	0,00	0,30	0,32	0,04	84,92	85,37	84,16	8,30	8,37	8,08	2,30	1,80	1,15
	4	28	7	0,02	0,03	0,01	0,13	0,19	0,02	85,22	85,26	84,89	8,39	8,46	8,14	2,60	2,00	1,03
	5	32	8	0,04	0,02	0,00	0,14	0,08	0,03	90,60	89,43	86,88	8,28	8,38	8,03	2,10	2,40	1,07
	6	36	9	0,05	0,04	0,02	0,13	0,05	0,03	86,95	89,30	83,31	8,33	8,41	8,06	2,70	1,50	1,25
	7	40	10	0,03	0,02	0,01	0,12	0,14	0,02	88,02	88,13	82,26	8,33	8,41	8,07	2,10	2,40	1,15
III	1	44	11	0,04	0,01	0,02	0,35	0,13	0,07	82,39	83,98	78,21	8,13	8,28	7,84	2,20	2,10	1,10
	2	48	12	0,06	0,04	0,02	0,28	0,15	0,09	82,93	82,66	77,51	8,16	8,24	7,75	2,20	2,20	0,90
	3	52	13	0,06	0,02	0,01	0,27	0,07	0,04	81,31	82,12	79,39	8,14	8,26	7,93	2,20	2,15	1,05
IV	1	56	14	0,05	0,04	0,02	0,59	0,17	0,04	77,64	77,47	68,87	8,17	8,32	7,87	2,30	2,20	0,90
	2	60	15	0,05	0,05	0,04	0,30	0,24	0,07	77,20	78,09	74,98	8,08	8,09	7,95	2,20	2,20	0,75
	3	64	16	0,07	0,09	0,05	0,46	0,95	0,09	75,10	75,78	75,15	8,11	8,03	7,96	2,30	2,40	1,28
	4	68	17	0,09	0,09	0,05	0,72	0,50	0,08	77,93	75,89	75,89	8,08	8,30	7,87	2,30	2,35	1,10
	5	72	18	0,10	0,06	0,06	0,22	2,53	0,09	75,88	76,93	75,73	8,15	8,24	7,86	2,25	2,30	1,28
	6	76	19	0,12	0,06	0,04	0,34	0,34	0,08	82,57	78,59	75,05	7,96	8,08	7,91	3,00	1,80	1,05
	7	80	20	0,08	0,06	0,03	0,12	0,88	0,09	81,32	79,41	74,18	8,17	8,26	7,97	2,45	2,30	1,33
	8	84	21	0,04	0,05	0,03	0,77	0,76	0,10	76,16	79,33	70,67	8,18	8,24	7,89	2,45	2,40	1,23
V	1	88	22	0,06	0,06	0,03	0,78	0,33	0,07	74,72	78,38	73,59	7,99	8,05	7,79	2,50	2,50	1,25
	2	92	23	0,07	0,07	0,05	0,89	0,44	0,07	73,80	78,33	76,21	8,08	8,11	7,97	2,45	2,55	1,30
	3	96	24	0,07	0,10	0,04	0,37	0,27	0,06	79,86	77,70	77,39	8,08	8,05	7,93	2,60	2,40	1,23
	4	100	25	0,08	0,06	0,01	0,54	0,32	0,08	75,62	78,33	76,35	8,02	8,10	7,74	2,40	2,45	1,35

(continuação da tabela anterior)

Tratamento			nº ciclo global	CQOT (g.L ⁻¹)			CQOs (g.L ⁻¹)			% CH ₄ no biogás			pH			Alcalinidade (g CaCO ₃ .L ⁻¹)		
Carga	nº ciclo	nº dias		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
V	5	104	26	0,08	0,07	0,03	0,64	0,20	0,08	77,19	77,66	76,17	7,97	8,09	7,79	2,55	2,45	1,35
	6	108	27	0,06	0,06	0,02	0,37	0,30	0,06	75,46	75,24	75,77	7,97	8,11	7,75	3,00	1,90	1,75
	7	112	28	0,06	0,03	0,03	0,56	0,22	0,06	76,87	79,55	77,33	8,16	8,25	7,97	2,45	2,60	1,24
VI	1	116	29	0,13	0,11	0,12	0,48	0,53	0,68	74,09	80,87	76,19	7,86	8,04	7,59	2,50	2,60	1,23
	2	120	30	0,16	0,12	0,10	0,50	0,38	0,61	77,03	78,06	75,64	7,84	7,99	7,65	2,79	3,50	1,13
	3	124	31	0,10	0,12	0,12	0,48	0,46	0,68	74,44	79,15	76,14	7,95	7,95	7,76	2,58	3,20	1,35
	4	128	32	0,11	0,12	0,10	0,47	0,95	0,29	72,85	75,84	74,60	7,95	7,88	7,65	2,40	2,55	1,30
	5	132	33	0,15	0,10	0,14	0,54	0,44	0,53	76,39	78,65	76,15	7,95	8,15	7,62	2,60	2,65	1,85
	6	136	34	0,11	0,11	0,15	0,52	0,47	0,42	73,93	78,79	71,38	8,05	8,16	7,74	2,75	2,93	1,30
	7	140	35	0,10	0,12	0,15	0,50	0,51	0,56	73,45	77,48	75,71	8,03	8,12	7,83	2,70	3,05	1,30
	8	144	36	0,10	0,10	0,12	0,41	0,36	0,33	73,58	77,50	73,07	7,91	8,10	7,75	2,35	3,00	1,35
	9	148	37	0,13	0,08	0,35	0,68	0,55	0,65	71,62	76,62	74,87	7,84	8,16	7,72	2,65	2,55	1,05
	10	152	38	0,19	0,17	0,18	0,58	0,90	0,90	69,50	72,61	73,51	7,95	8,17	7,82	2,45	2,35	1,33
VII	1	156	39	0,26	0,23	0,32	0,26	1,00	0,72	64,58	69,99	69,69	7,95	8,13	7,66	2,55	2,75	1,43
	2	160	40	0,37	0,38	0,32	0,70	0,67	1,23	67,35	70,14	72,59	7,93	8,11	7,64	2,82	2,88	1,79
	3	164	41	0,55	0,70	0,26	1,25	1,09	0,88	69,23	70,20	72,98	7,95	7,94	7,75	2,85	2,40	1,50
	4	168	42	0,28	0,25	0,27	1,83	1,19	0,81	69,07	70,07	73,35	7,92	8,11	7,71	2,90	2,85	1,08
	5	172	43	0,22	0,23	0,27	1,24	0,60	0,77	70,53	74,74	73,66	8,10	8,24	7,68	2,75	2,65	1,50
	6	176	44	0,21	0,23	0,23	2,04	2,04	0,66	70,37	74,52	72,51	8,09	8,19	7,80	2,90	2,80	1,40
	7	180	45	0,23	0,21	0,20	0,56	0,80	0,68	69,20	77,26	74,29	7,91	8,32	7,76	2,80	2,80	1,48
	8	184	46	0,25	0,22	0,23	1,26	0,56	0,69	71,05	75,12	71,72	7,97	8,11	7,95	2,90	3,35	1,00
	9	188	47	0,23	0,15	0,17	0,75	0,97	0,59	70,24	73,41	74,10	8,15	8,27	7,93	2,65	2,85	1,13
	10	192	48	0,43	0,30	0,20	1,07	1,33	1,23	66,96	70,84	73,00	7,82	8,03	7,80	2,80	2,85	1,48
	11	196	49	0,28	0,14	0,21	0,44	0,48	1,78	68,94	74,62	73,66	8,10	8,41	7,97	2,75	3,25	1,45

(continuação da tabela anterior)

[illegible]

(continuação da tabela anterior)

Tratamento		nº ciclo global	Ácido n-valérico (mg Ac.L-1)			Ácido capróico (mg Ac.L-1)			AOV _T (mg Ac.L ⁻¹)				A/A		
nº ciclo	nº dias		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
VI	1	116	29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	120	30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	124	31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,11	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	128	32	12,35	13,90	6,95	0,00	0,00	0,00	12,35	13,66	6,95	0,01	0,01	0,01
	5	132	33	17,43	24,20	12,10	0,00	0,00	7,57	17,43	76,88	19,67	0,01	0,03	0,01
	6	136	34	21,34	14,32	13,79	0,00	0,00	0,00	21,34	13,11	13,79	0,01	0,00	0,01
	7	140	35	18,26	38,25	24,21	0,00	0,00	6,68	18,26	12,10	39,25	0,01	0,00	0,03
	8	144	36	17,60	13,56	6,78	0,00	0,00	0,00	17,60	0,00	6,78	0,01	0,00	0,01
	9	148	37	22,29	10,59	5,30	0,00	0,00	0,00	103,35	15,48	83,36	0,04	0,01	0,08
	10	152	38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	67,38	82,94	107,92	0,03	0,04	0,08
VII	1	156	39	0,00	0,00	0,00	0,00	15,56	0,00	155,61	179,11	158,28	0,06	0,07	0,11
	2	160	40	0,00	4,71	8,79	0,00	0,00	0,00	162,83	319,69	154,41	0,06	0,11	0,09
	3	164	41	0,00	6,45	6,87	0,00	0,00	0,00	294,34	331,02	167,46	0,10	0,14	0,11
	4	168	42	0,00	18,88	9,44	0,00	0,00	17,26	0,00	93,45	161,02	0,00	0,03	0,15
	5	172	43	4,96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	148,87	40,49	117,54	0,05	0,02	0,08
	6	176	44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	60,75	54,58	86,91	0,02	0,02	0,06
	7	180	45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	67,24	44,13	75,28	0,02	0,02	0,05
	8	184	46	0,00	4,85	2,42	0,00	0,00	0,00	73,16	111,35	75,57	0,03	0,03	0,08
	9	188	47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	65,69	51,97	61,78	0,02	0,02	0,05
	10	192	48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	115,95	94,39	64,26	0,04	0,03	0,04
	11	196	49	0,00	6,01	3,00	0,00	0,00	0,00	96,21	59,21	132,39	0,03	0,02	0,09